



# Fonction et régulation des gènes de biosynthèse des acides mycoliques chez les mycobactéries

Stevie Jamet

## ► To cite this version:

Stevie Jamet. Fonction et régulation des gènes de biosynthèse des acides mycoliques chez les mycobactéries. Bactériologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30264 . tel-01387990

**HAL Id: tel-01387990**

**<https://theses.hal.science/tel-01387990>**

Submitted on 26 Oct 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**JAMET Stevie**

**le** mardi 22 septembre 2015

**Titre :**

Fonction et régulation des gènes de biosynthèse des acides mycoliques chez  
les mycobactéries

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Microbiologie

**Unité de recherche :**

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale - CNRS UMR5089

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Dr. CAM Kaymeuang

**Jury :**

Dr. BOUVERET Emmanuelle, Directeur de recherche, Marseille

Dr. JACQ Annick, Directeur de recherche, Orsay

Dr. MOLLE Virginie, Directeur de recherche, Montpellier

Dr. ARLAT Matthieu, Professeur, Toulouse

Dr. GUILHOT Christophe, Directeur de recherche, Toulouse

Dr. CAM Kaymeuang, Maître de conférence, Toulouse

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse



# REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite évidemment remercier chacun des membres du jury (M. Arlat, C. Guilhot, E. Bouveret, V. Molle & A. Jacq) pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et d'être venu assister à la soutenance. Je remercie particulièrement les 3 rapportrices qui ont dûes lire ce manuscrit et écrire leur rapport pendant le mois d'août.

## **Un grand MERCI à :**

Mamadou, pour m'avoir accueilli dans votre équipe et pour tout le soutien que vous portez à chaque thésard qui passe dans l'équipe. Merci également pour votre attention, votre écoute et toutes les discussions scientifiques que l'on a pu partager.

Kaymeuang, d'abord pour m'avoir encadré et formé à la recherche scientifique, pour tous vos conseils avisés et surtout pour m'avoir fait entièrement confiance pendant plus de 3 ans !! Je vous remercie aussi pour votre optimisme inépuisable que j'ai beaucoup apprécié lorsque les résultats manquaient un peu !! Je tiens également à vous remercier pour votre investissement pour la rédaction du manuscrit de thèse et votre patience pour la préparation de l'oral...

Et évidemment un énorme merci à tous les autres titulaires de l'équipe Daffé. Tout d'abord, Françoise, pour ta grande implication dans ces travaux de thèse et ton enthousiasme indéfectible :) Merci aussi à Nathalie et Annaïk pour m'avoir tout appris sur les fameuses enzymes HadABC, et pour m'avoir enseigné quelques bases en enzymo et en bioch' !! Merci également à Patricia, pour sa bonne humeur constante et de m'avoir formé au P3. Merci à Isabelle, pour toutes nos discussions sur les cellules eucaryotes et les manips d'infections. Je remercie aussi Gilles, pour sa culture scientifique et sa capacité à répondre à "presque" toutes les questions en biologie ! Merci aussi à Fabienne, pour sa spontanéité et tous ses conseils lors des réunions d'équipe; merci à Anne, pour sa jovialité permanente et ses innombrables jeux de mots à 2 balles :) Je remercie également Marielle et Hédia pour leur bienveillance et leur gentillesse.

Et puis je veux aussi remercier chaleureusement tous mes comparses non titulaires (les jeunes !). Clément, avec qui j'ai partagé paillasse pendant une bonne partie de ma thèse, mais aussi quelques bières !! Merci aussi de m'avoir transmis tous tes petits tuyaux qui facilitent la vie au labo (cachette de consommables dans le labo Daffé :), expression phénotypique "supersonique"....!!).

Lucie, pour être toujours souriante, et d'avoir supporter nos sempiternelles blagues misogynes à la pause café (A Clément et moi) !! Je remercie aussi Kanjana pour sa gentillesse et tous les cafés l'on a partagé, et pour avoir supporter nos négligences sur le ménage du labo (encore Clément et moi...) !! Je veux aussi remercier Nawel, pour sa sincérité et toutes les discussions que l'on a partagées. Je souhaite aussi remercier les autres thésards actuelle de l'équipe : Aïcha (pour moi tu es toujours de l'équipe Daffé!!), Richard, Laura, Hung et Cyril. Je remercie particulièrement Aïcha, avec qui j'ai partagé mon bureau pendant quelques mois et qui m'a tout appris sur le monde des macrophages !! Merci aussi à Richard, pour ses gâteaux et parce que comme moi, Richard est convaincu que les bactéries sont bien plus fortes que les cellules eucaryotes (au grand dam d'Aïcha).

Sans la famille et les amis la vie le vie serait toute pourrie !! Je remercie ma mère, mon père et mon beau père qui me soutiennent et m'encouragent depuis toujours et à qui je dois énormément :) Merci à mon père également pour avoir corrigé les fautes d'orthographe que j'avais laissées dans ce manuscrit (normalement il n'y en a plus !). Merci aussi à tous mes amis, avec une dédicace spéciale pour les amis de Toulouse, Elise, Alix, Natacha, Clément, Christophe et Pierre à qui je souhaite bonheur et de réaliser leur rêves professionnels.

Evidement, je remercie aussi Sarah, qui partagent ma vie et qui me remplis de bonheur chaque jour depuis plus de 5 ans. Etant indispensable à ma vie (bah ui !), tu as été évidemment indispensable à la réussite de ma thèse :) Je sais que ce n'est pas toujours facile de supporter un thésard démoralisé et qui a la tête dans le guidon, mais tu as toujours été là pour me requinquer et me recentrer !! Et je ne te remercierais jamais assez de me soutenir chaque jour dans mes choix, même si certains sont parfois de jolies lubies...

# Résumé

*Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) l'agent étiologique de la tuberculose infecte un tiers de la population mondiale avec 9 millions de nouveaux cas et 1.5 millions de décès chaque année. La capacité de la bactérie à persister dans son hôte ainsi que l'apparition croissante de souches multi-résistantes voire totalement résistantes expliquent ces statistiques dramatiques. La découverte de nouveaux traitements à travers une meilleure connaissance de la physiologie et des programmes génétiques adaptatifs du pathogène est donc une priorité mondiale.

*M.tb* est un bacille à Gram+ avec une enveloppe particulière caractérisée par une membrane externe (la mycomembrane) essentielle à sa viabilité et sa virulence. Cette membrane est constituée majoritairement d'acides mycoliques (AMs), des acides gras à très longues chaînes modifiés par l'introduction de groupements fonctionnels. Bien qu'à ce jour la biosynthèse des AMs est relativement bien caractérisée d'un point de vue biochimique, certaines données nécessitent d'être confirmées *in vivo*, de même qu'il existe peu d'information sur la régulation et la contribution des gènes de biosynthèse à la capacité adaptative des mycobactéries.

Une trentaine de gènes sont impliqués dans la biosynthèse des AMs dont *hadA*, *hadB* et *hadC* codant pour une réaction de déshydratation essentielle. Il a été démontré biochimiquement que HadB porte l'activité catalytique et que HadA et HadC apportent la spécificité de substrats. Au cours de ma thèse, par une approche génétique, nous avons montré que seule HadB était essentielle à la viabilité mais que HadA et HadC bien que non essentielles jouaient un rôle majeur dans la physiologie, la capacité adaptative et la virulence des mycobactéries, en relation avec leur rôle dans la structure des AMs. Ces résultats avaient non seulement confirmé les données biochimiques quant au rôle de HadC dans la biosynthèse des AMs, mais également souligné l'intérêt d'une stratégie de lutte basée sur l'affaiblissement du fitness de *M.tb*, rendant ainsi le pathogène plus sensible aux traitements déjà existants ainsi qu'aux défenses naturelles de l'hôte.

Une analyse phylogénétique couplée à une analyse expérimentale de l'expression des gènes nous a permis de retracer et de rationaliser le scénario évolutif qui a façonné le locus *hadABC*. En accord avec l'organisation génétique, j'ai ainsi montré que la carence en nutriments, un stress rencontré par la bactérie lors de l'infection, conduisait à la co-répression des gènes *hadABC* ainsi que de la plupart des gènes de biosynthèse des AMs avec des gènes impliqués dans le processus de traduction. Le potentiel de traduction est connu pour être contrôlé par la disponibilité en nutriments, à travers notamment la réponse stringente, une réponse adaptative universellement conservée chez les bactéries. Suite à ces résultats, un modèle a été proposé selon lequel au cours de la réponse stringente, les intermédiaires de synthèse des AMs, seraient détournés au profit de la synthèse de lipides alternatifs dont des lipides de stockage. L'analyse phylogénétique a également suggéré une relation fonctionnelle étroite entre l'activité des enzymes HadABC et des enzymes responsables de la modification des AMs.



Afin d'avoir une vision intégrée de la régulation de la synthèse de la mycomembrane, nous avons analysé le rôle biologique du gène *rv0081* codant pour un facteur de transcription global. Différentes approches systémiques suggéraient que Rv0081 jouerait un rôle central dans la capacité adaptative de *M.tb* en régulant de nombreux gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires dont les gènes *hadABC*. J'ai pu montrer qu'un mutant *rv0081* était hypervirulent et que l'absence d'une régulation naturelle du gène affectait la capacité de survie de la bactérie à l'intérieur des macrophages.

---

*Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*), the causative agent of tuberculosis infects one third of the world population with 9 million new cases and 1.5 million deaths each year. The capability of the bacteria to persist in its host and the emergence of multi- and totally-drug resistant strains explain these dramatic statistics. Therefore, the discovery of new drugs through a better understanding of the physiology and of the adaptive genetic programs of the pathogen is a priority.

*Mtb* is a Gram + bacilli with an unusual cell envelope characterized by an outer membrane (the mycomembrane) essential to its viability and virulence. This membrane is mainly composed of mycolic acids (MAs), a class of very long chain fatty acids which are modified by the introduction of functional groups. To date the biosynthesis of MAs is biochemically well characterized, but some data need to be confirmed in vivo, likewise there is little information about the regulation and the contribution of biosynthesis genes in the adaptive capacity of mycobacteria.

Around thirty genes are involved in the biosynthesis of MAs including *hadA*, *hadB* and *hadC* which are required for an essential dehydration reaction. It has been shown biochemically that HadB bears the catalytic activity and that HadA and HadC bring about the substrate specificity. In this study, using a genetic approach, we have shown that only HadB was essential to the viability but that the non-essential HadA and HadC proteins played a major role in the physiology, the adaptive capacity and the virulence of mycobacteria. These results have not only confirmed the biochemical data on the role of HadC in the biosynthesis of MAs, but have also underlined the relevance of a strategy based on weakening the fitness of *Mtb*, making the pathogen more susceptible to existing therapy as well as to the natural host defenses.

Phylogenetic and experimental analyses of gene expression allowed us to rationalize the evolutionary scenario that has shaped the *hadABC* locus. In agreement with the genetic organization, I have shown that starvation, a stress experienced by the bacterium upon infection, resulted into the co-repression of the genes *hadABC* as well as most of the MAs biosynthetic genes with genes involved in the translation process. The translation potential is known to be controlled by nutrient availability, especially through the stringent response, an adaptive response widely conserved in bacteria. Following these results a model was proposed stating that during the stringent response, the MAs intermediate products would be redirected toward the synthesis of alternate lipids including storage lipids. Phylogenetic analysis also





suggested a close functional relationship between the activity of HadABC proteins and the enzymes involved in the modification of MAs.

In order to get an integrated picture of the regulation of the biosynthesis of the mycomembrane, we analyzed the biological role of *rv0081*, a gene encoding a transcription factor. Various comprehensive approaches suggested that Rv0081 plays a key role in *M.tb* adaptive capacity through the regulation of many genes involved in various cellular functions including the *hadABC* genes. In my PhD work I have shown that an *rv0081* deleted strain was hypervirulent and that the inability of the bacteria to properly regulate the gene had prevented the bacteria to survive within macrophages.



# Sommaire

<b>Résumé</b>	<b>1</b>
<b>Sommaire</b>	<b>4</b>
<b>Introduction</b>	<b>7</b>
<b>I. La tuberculose</b>	<b>8</b>
A. Epidémiologie	8
a) Généralités	8
b) Les autres agents étiologiques de la tuberculose humaine	8
c) Des inégalités face à la tuberculose	9
B. La prévention	11
a) Le diagnostic	11
b) Le vaccin BCG	12
c) Les nouveaux vaccins	13
i. Les vaccins type "Prime"	13
ii. Les vaccins type "Booster"	14
iii. Les vaccins thérapeutiques	14
d) La "double-vie" du vaccin BCG	15
C. Traitement	15
a) Le traitement actuel	15
b) Les futurs traitements disponibles	17
i. Les composés réorientés pour la lutte contre la tuberculose	17
ii. Les composés nouveaux développés spécifiquement pour la lutte contre la tuberculose	17
c) Les stratégies de lutte contre la tuberculose	18
<b>II. Adaptation de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> à son hôte</b>	<b>20</b>
A. Les mycobactéries	20
B. Présentation générale du cycle infectieux de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
C. Les mécanismes de résistance de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> face aux attaques du macrophage	22
a) Résistance à l'acidification	22
i. Neutralisation du pH acide par la production d'ammoniac	23
ii. L'inhibition de la fusion phagosome-lysosome	23
b) Résistance aux espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	24
i. Résistance au stress oxydatif par la détoxification	24
ii. Résistance au stress oxydatif par la réparation des dommages et la dégradation des biomolécules affectées	25
c) Résistance à l'intoxication au cuivre et au zinc	26
d) Résistance aux peptides cationiques antimicrobiens	26



e) La résistance par la fuite : l'échappement du phagosome	27
<b>D. Les mécanismes de régulation impliqués dans la survie à long terme de la bactérie</b>	<b>28</b>
a) Le système DosR/ST	28
b) La réponse stringente	31
i. La réponse stringente et l'adaptation des bactéries aux stress environnementaux	31
ii. La réponse stringente chez les mycobactéries	32
iii. La voie de signalisation Polyphosphate-MprAB-SigE-Rel <sub>mtb</sub>	35
<b>III. L'enveloppe mycobactérienne</b>	<b>37</b>
<b>A. Structure et composition de l'enveloppe mycobactérienne</b>	<b>37</b>
a) La membrane plasmique	37
b) Le mycolyl-Arabinogalactane-Peptidoglycane (mAGP)	38
i. Le peptidoglycane	38
ii. L'arabinogalactane	38
iii. Les acides mycoliques	39
c) Les autres lipides	39
d) La capsule	41
<b>B. Rôles de l'enveloppe</b>	<b>41</b>
a) L'enveloppe est une barrière physique très imperméable	41
b) Implication des lipides de l'enveloppe dans la pathogénicité	42
<b>IV. Les acides mycoliques : biosynthèse et régulation</b>	<b>44</b>
<b>A. Vue d'ensemble de la biosynthèse</b>	<b>44</b>
<b>B. FAS-I : synthèse de la chaîne <math>\alpha</math> et du précurseur de FAS-II</b>	<b>45</b>
<b>C. FAS-II : Synthèse de la chaîne méromycolique</b>	<b>45</b>
a) Initiation	46
b) Elongation	47
i. Les réductases MabA et InhA	47
ii. Les condensases KasA et KasB	48
iii. Les déshydratases HadAB et HadBC	49
c) Modification par des méthyltransférases	51
<b>D. La condensation "mycolique" finale</b>	<b>52</b>
<b>E. Transport et devenir des acides mycoliques</b>	<b>53</b>
<b>F. Interactome des enzymes de FAS-II et des méthyltransférases</b>	<b>54</b>
<b>G. Régulation de la biosynthèse des acides mycoliques</b>	<b>55</b>
a) Les mycobactéries contrôlent la composition de leur mycomembrane	55
b) Les régulateurs transcriptionnels	56
i. MabR (Rv2242, Mycolic acid biosynthesis Regulator)	57
ii. FasR (Rv3208, Fatty acids synthesis Regulator)	57
iii. FadR <sub>M.tb</sub> (Rv0494, Fatty acid metabolism Regulator)	58
iv. LtmA (MSMEG_6479, Lipid transport and metabolism Activator)	58
c) Contrôle post-traductionnel	59



i.	La régulation par les protéines GroEL1 et EccA1	59
ii.	La régulation par la phosphorylation	60
<b>V.</b>	<b>Objectifs de thèse</b>	<b>63</b>
	<b>Résultats</b>	<b>64</b>
<b>I.</b>	<b>Rôle biologique des sous-unités des déshydratases HadAB et HadBC chez <i>M.tuberculosis</i> et <i>M.smegmatis</i></b>	<b>65</b>
A.	Résumé des articles	65
B.	Article : "Non-essential outer membrane mycolate biosynthesis gene dramatically contributes to the fitness of <i>Mycobacterium smegmatis</i> "	68
C.	Article : "The change in mycolic acid structure caused by <i>hadC</i> mutation have a dramatic effect on virulence of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> "	69
<b>II.</b>	<b>Expression, régulation et évolution des gènes <i>hadABC</i> chez <i>M.tuberculosis</i></b>	<b>70</b>
A.	Résumé d'article	70
B.	Article : "Evolution of mycolic biosynthesis genes and their regulation during starvation in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> "	72
<b>III.</b>	<b>Etude du rôle biologique du régulateur transcriptionnel <i>Rv0081</i> chez <i>M.tuberculosis</i></b>	<b>73</b>
A.	Hypothèse de travail	73
B.	Résultats	74
a)	<i>Rv0081</i> ne contribue pas à l'expression des gènes de biosynthèse des AMs en phase exponentielle de croissance	74
b)	<i>Rv0081</i> n'a pas d'impact fort sur la physiologie de <i>M.tuberculosis in vitro</i>	75
c)	La perte et la dérégulation de <i>rv0081</i> modifient la réponse adaptative de <i>M.tuberculosis</i> à l'intérieur des macrophages	78
d)	Discussion	79
	<b>Discussion et perspectives</b>	<b>81</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>90</b>





# Introduction



# I. La tuberculose

## A. Epidémiologie

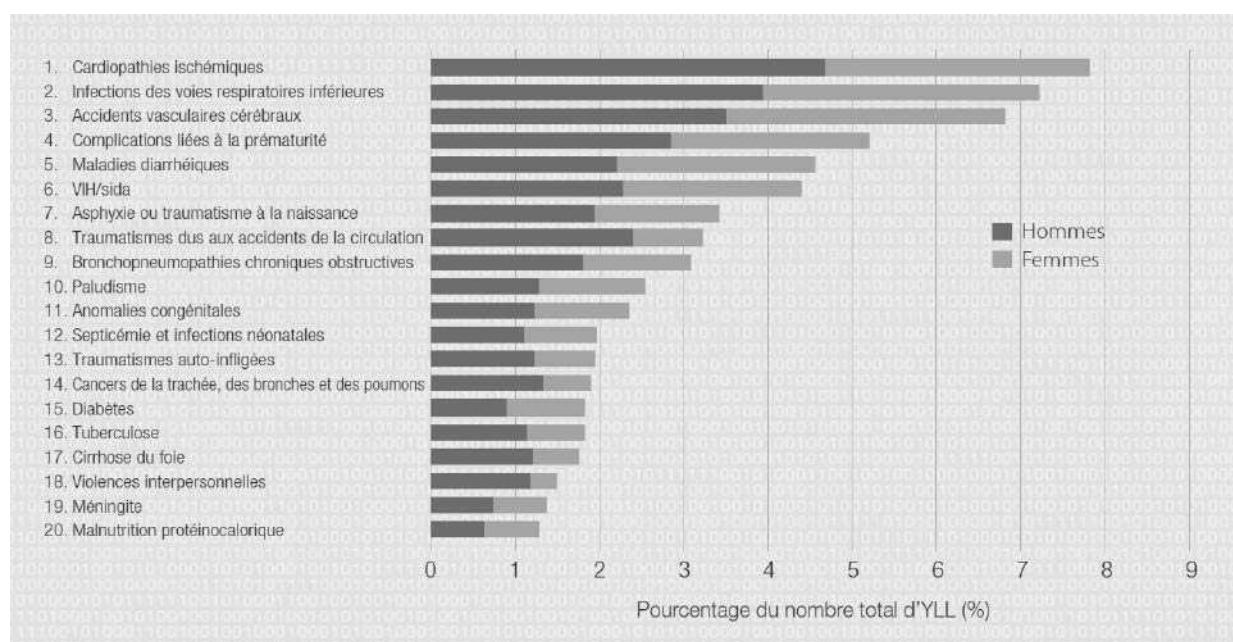
### a) Généralités

La tuberculose est une maladie infectieuse parmi les plus meurtrières pour l'Homme. En 2013, 9 millions de personnes ont développé cette maladie et 1,5 millions en sont mortes (Global tuberculosis report WHO, 2014), ce qui classe la tuberculose au 16<sup>ème</sup> rang des causes de décès prématurés (**Figure 1**). La tuberculose peut se manifester sous de nombreuses formes car tous les tissus et organes peuvent être touchés, à l'exception des ongles et des cheveux. Mais en représentant à elle seule plus de 70% des cas, la tuberculose pulmonaire est la forme la plus répandue (Kulchavenya, 2014).

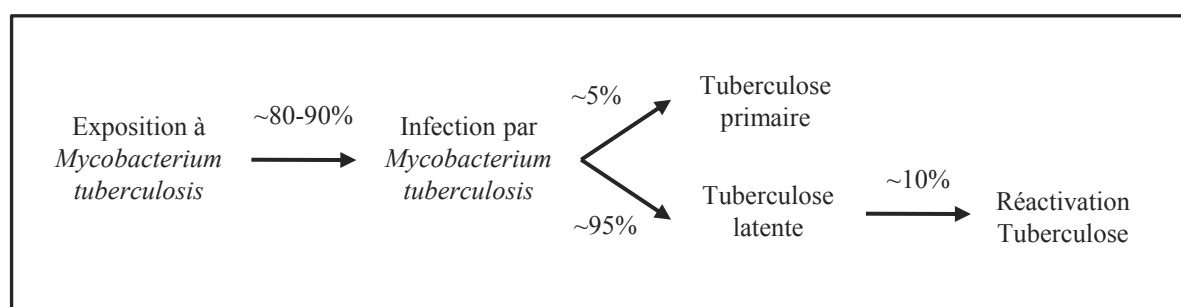
Dans la majorité des cas la tuberculose est causée par *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*), une bactérie intracellulaire facultative à croissance lente. Les symptômes principaux d'une tuberculose pulmonaire (ou phtisie) sont une forte toux (parfois sanglante), une perte de poids, des sueurs nocturnes, de la fièvre, des difficultés respiratoires et une adénopathie. En général, la bactérie se transmet par la simple inhalation de gouttelettes émises par un individu malade. On estime de 80 à 90% le risque qu'un individu sain soit infecté suite à un contact rapproché avec un individu malade (Abel et al., 2014). Dans 5% des cas, l'individu infecté va développer une tuberculose active dans les deux ans (tuberculose primaire), c'est à dire qu'il présentera les symptômes de la maladie et sera contagieux. Cependant, dans la majorité des cas (95%), la personne infectée sera porteur sain de la bactérie. On estime ainsi aujourd'hui qu'un tiers de l'humanité est infectée de manière latente (Young et al., 2009). Cela représente un réservoir important pour la bactérie, qui pourrait lui être nécessaire pour compenser sa faible capacité de survie dans l'environnement (Rickards et al., 1909). Pour 5 à 10% des personnes infectées de manière latente ou asymptomatique, il y aura réactivation et la maladie évoluera vers sa forme active, conduisant potentiellement à la mort pour 50% d'entre eux si aucune thérapie n'est engagée [**Figure 2** (Abel et al., 2014; Murray et al., 1990)]. Ce risque de réactivation est important mais semble diminuer avec le temps (Vynnycky and Fine, 2000).

### b) Les autres agents étiologiques de la tuberculose humaine

Deux autres espèces bactériennes ont une responsabilité significative dans le nombre de cas de tuberculose, il s'agit de *Mycobacterium bovis* (*M.bovis*) et de *Mycobacterium*



**Figure 1. Les 20 premières causes de décès prématurés à l'échelle mondiale.** Statistiques exprimées en pourcentage du nombre total d'années de vie perdues (YLL). World Health Statistics WHO, 2014



**Figure 2. Evaluation des risques encourus par une personne suite à son exposition à un individu malade, et les évolutions possibles de l'infection.** Adapté de Abel et al, 2014.

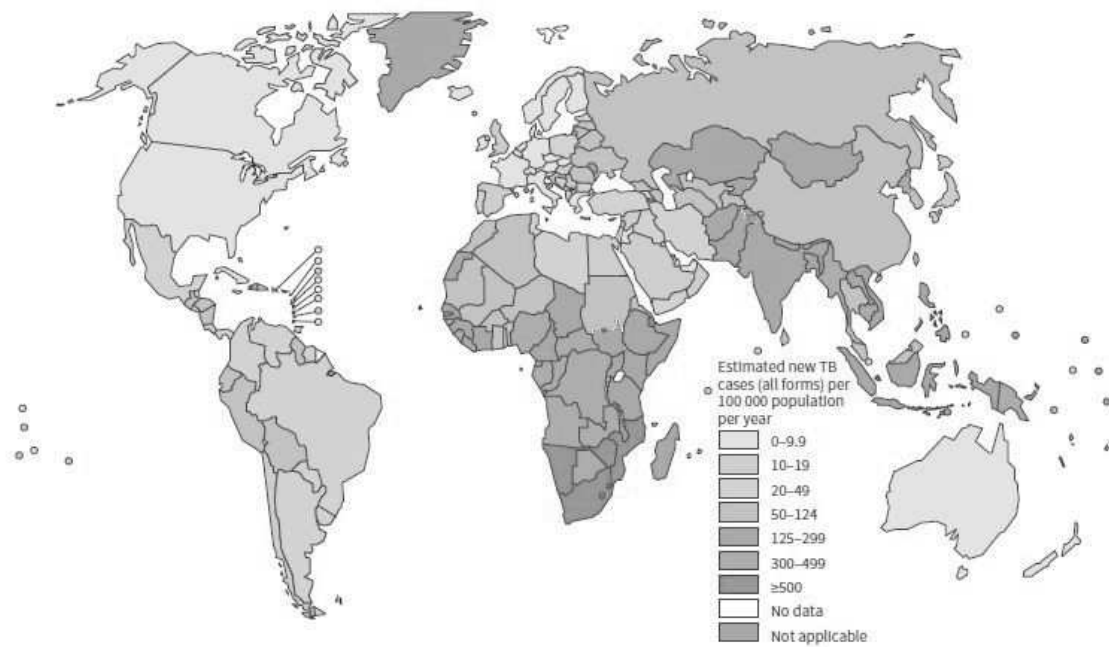
*africanum* (*M.af*). Ces deux espèces induisent une pathologie similaire indistinguishable cliniquement, radiologiquement et histopathologiquement d'une tuberculose causée par *M.tb* (de Jong et al., 2010; de la Rua-Domenech, 2006).

De manière intéressante, les cas de tuberculose causés par *M.af* sont localisés en Afrique de l'Ouest, avec une prévalence oscillant entre 2% et plus de 50% selon le pays considéré (de Jong et al., 2010). Quelques cas ont été recensés en Europe, mais en général les individus malades étaient des immigrants venus d'Afrique probablement infectés avant leur départ. Une étude récente a montré que les individus d'un groupe ethnique particulier, les Ewe, très représentés en Afrique de l'ouest, étaient davantage prédisposés que d'autres populations à une tuberculose causée par *M.af* plutôt que par *M.tb* indépendamment de leur lieu de vie (Asante-Poku et al., 2015). Ainsi, les auteurs suggèrent que la restriction géographique et la forte prévalence de *M.af* en Afrique de l'ouest pourraient être dues au fait que *M.af* se soit adapté au cours du temps à cette population particulière.

Contrairement à *M.tb* et *M.af* qui sont des espèces pathogènes spécifiques de l'Homme (de Jong et al., 2010), *M.bovis* peut infecter une grande variété d'hôtes dont les bovins (hôtes principaux), les chiens, les chats, les chèvres, le porc, le cheval, et certains animaux sauvages ainsi que l'Homme (O'Reilly and Daborn, 1995). Il existe peu de données permettant d'évaluer précisément la prévalence des tuberculoses humaines causées par *M.bovis*, mais certaines études l'estiment à 10-15% (Cosiviet al, 1998; Ashford et al, 2001). La transmission de cette bactérie chez l'Homme est principalement zoonotique, la transmission interhumaine étant considérée comme extrêmement rare. Généralement, la transmission de l'animal à l'homme s'établit par la consommation de lait d'un bovin contaminé, c'est pourquoi depuis la généralisation de la pasteurisation du lait la prévalence globale de tuberculose causée par *M.bovis* a fortement chuté, notamment en Europe (Pérez-Lago et al., 2014). Cependant, dans les pays où la pasteurisation n'est pas systématique ces pourcentages restent très élevés et préoccupants, c'est le cas de pays en développement comme le Mexique [13,8% (Pérez-Guerrero et al., 2008)] ou l'Uganda [7% (Oloyaet al, 2008)].

### **c) Des inégalités face à la tuberculose**

Au niveau mondial, la répartition des cas de tuberculose est fortement inégalitaire (**Figure 3**). En effet, les 22 pays les plus touchés concentrent à eux seuls 81% des cas (Global tuberculosis report WHO, 2014). Dans ces pays, tous considérés en « développement », les



**Figure 3. Estimation en 2013 de l'incidence de la tuberculose dans le monde.**  
Global tuberculosis report WHO, 2014

populations sont souvent confrontées à la surpopulation, à une mauvaise hygiène, à des problèmes d'insalubrité et de malnutrition, autant de facteurs favorisant l'affaiblissement du système immunitaire et donc, rendant les individus plus sensibles aux attaques de pathogènes comme *M.tb* (Katona and Katona-Apte, 2008).

Dans ces pays, la prévalence du VIH y est aussi très élevée. Or la tuberculose est également une des causes principales de décès chez les individus VIH-positives. Il est estimé que 13% des personnes atteintes de tuberculose en 2013 sont aussi infectées par le VIH (Global tuberculosis report WHO, 2014). Pour ces personnes co-infectées, en raison de leur immunodépression, le risque de réactivation d'une tuberculose latente est 20 fois plus élevé que chez une personne VIH-négative (Pawlowski et al., 2012).

Le diabète est une autre maladie aggravant la susceptibilité à la tuberculose, en augmentant d'un facteur 3 le risque d'être atteint par la tuberculose. De plus, les personnes diabétiques développent des tuberculoses plus sévères aggravant leur pronostic vital, et présentent également un risque de rechute après traitement plus important (Dooley and Chaisson, 2009). L'altération de plusieurs fonctions importantes des macrophages (*e.g.* chimiotactisme, phagocytose) et des lymphocytes (*e.g.* production d'interféron gamma, prolifération) chez ces patients est probablement une cause de cette susceptibilité accrue à la tuberculose.

Certains polymorphismes génétiques favorisent le développement de la tuberculose dans plusieurs populations (Abel et al., 2014). C'est le cas notamment pour le gène *NRAMP1* (ou *SLC11A1*), dont plusieurs polymorphismes sont associés à une susceptibilité accrue à la tuberculose chez certaines populations africaines et asiatiques (Gros et al., 1981; Li et al., 2006). En plus de cette variabilité entre individus, il existe également une inégalité entre les sexes, les hommes étant davantage touchés que les femmes avec des ratios hommes/femmes compris entre 2:1 et 3:1 selon la région considérée (Global tuberculosis report WHO, 2014). Cette disparité est encore mal comprise, mais pourrait être expliquée au moins en partie par des différences des taux d'hormones sexuelles stéroïdiennes. Notamment, l'œstradiol en stimulant l'activation des macrophages a un effet protecteur, au contraire de la testostérone qui en inhibant la production de cytokines comme l'interféron gamma (INF- $\gamma$ ), ne permet plus de stimuler l'activité microbicide des macrophages (Janele et al., 2006; Neyrolles and Quintana-Murci, 2009).





A tous ces facteurs « non contrôlables » par l'individu s'ajoutent d'autres facteurs qui sont directement liés au comportement de la personne, comme la consommation excessive d'alcool et le tabagisme (Oztürk et al., 2014). La consommation de tabac, par exemple, est connue pour altérer les fonctions de cellules immunitaires comme les macrophages alvéolaires (*e.g.* fusion phagosome/lysosome, autophagie) ou les neutrophiles (*e.g.* production d'espèces réactives de l'oxygène) [pour revue (Chan et al., 2014)]. Ainsi un fumeur sera plus susceptible de développer la tuberculose qu'une personne n'ayant jamais fumé.

## **B. La prévention**

### **a) Le diagnostic**

Un diagnostic rapide et correct est nécessaire dans la bataille contre la tuberculose. Un diagnostic précoce permet de débiter le traitement rapidement et limite l'expansion de la maladie. Les signes cliniques décrits précédemment [**voir Introduction § I, A, a)**] et la prédisposition de l'individu malade (*e.g.* région à forte endémie, personne immunodéprimée, antécédent de tuberculose dans l'entourage...) sont les premières alertes permettant de suspecter une tuberculose. Il est nécessaire ensuite de réaliser une radiographie thoracique, qu'une forme pulmonaire soit suspectée ou non. L'intradermoréaction à la tuberculine (ou Tubertest®) peut aider au diagnostic, cependant l'interprétation de ce test peut être délicate et des réactions croisées provoquées par le contact de l'individu avec une mycobactérie environnementale peut générer des faux-positifs (Farhat et al., 2006). Pour compléter ces analyses, la présence de bacilles tuberculeux est recherchée dans les expectorations. Dans ces échantillons, les bactéries sont identifiées par observation microscopique après une coloration de Ziehl-Neelsen. Cette technique a l'avantage d'être rapide et peu coûteuse, même si elle reste moins sensible que la mise en culture qui permet la détection d'une dizaine de bactéries seulement. Néanmoins pour celle-ci, à cause de la croissance très lente du bacille tuberculeux, il faut attendre au moins deux semaines avant de pouvoir interpréter les résultats.

L'amplification génique de loci spécifiques de l'agent pathogène est un outil récent qui permet d'identifier précisément l'espèce responsable de la maladie (*i.e.* *M.tb*, *M.bovis*, *M.af*). Cette méthode très rapide peut également permettre de mettre en évidence des résistances génotypiques à certains antibiotiques, c'est le cas par exemple pour détecter des souches résistantes à la rifampicine et l'isoniazide (Boehme et al., 2010; Ramirez et al., 2010).



Cependant cette technique n'est pas encore généralisable à toutes les résistances et, dans ces cas, un antibiogramme reste utile.

Des systèmes de détection comme le QuantiFERON®-TB gold sont aussi utilisés. Il s'agit d'un test basé sur la méthode immuno-enzymatique ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) qui repose sur la détection et la quantification de l'INF- $\gamma$  libérée par les cellules immunitaires du sang du patient après le contact avec un cocktail d'antigènes de *M.tb* [les protéines ESAT-6, CFP-10 et Tb7.7 ; (Mazurek et al., 2005)]. Le coût de ce type de test est encore élevé, mais cette méthode présente les avantages d'être rapide, sensible et de permettre la détection des formes actives et latentes de tuberculose.

## **b) Le vaccin BCG**

Le vaccin BCG, administré pour la première fois en 1921, reste à ce jour le seul vaccin disponible contre la tuberculose. Depuis sa découverte, 4 milliards de personnes ont été vaccinées et chaque année le vaccin est administré à 120 millions d'enfants (Dalmia and Ramsay, 2012). Le BCG est issu d'une souche de *M.bovis* virulente isolée du lait d'une vache atteinte de tuberculose par Nocard au début du XX<sup>ème</sup> siècle. Pour obtenir le vaccin BCG, 13 années de passages successifs *in vitro* (230 passages au total) ont été nécessaires à Calmette et Guérin pour atténuer la souche virulente originelle. Ce vaccin protège efficacement les enfants contre la tuberculose méningée et la tuberculose miliaire (entre 75% et 80% d'efficacité), qui sont des formes très graves de la maladie. En revanche, la protection mondiale moyenne du BCG contre la tuberculose pulmonaire chez l'adulte n'est que de 50% (Colditz et al., 1994), et serait même nulle dans certaines régions (Fine, 1995). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer cette efficacité faible et variable du vaccin.

La diversité génétique des souches de BCG utilisées est la cause la plus souvent citée. En effet, depuis 1924 et le début la distribution du BCG à travers le monde, de nombreux pays ont réalisé des passages successifs *in vitro* (souvent > 1000 passages) de la souche originelle afin de maintenir leur stock, favorisant ainsi de nouveaux événements de mutation et donc l'émergence de nouvelles souches. Ainsi, on dénombre aujourd'hui 13 variants génétiques utilisés dans le monde, possédant des phénotypes morphologiques, biochimiques et immunologiques différents (Liu et al., 2009).

Nom du vaccin	Composition	Stratégie	Phase clinique
<b>Vaccins viraux</b>			
TB/FLU-04L	Virus influenza recombinant exprimant Ag85A et ESAT6	Booster	I
MVA85A	Virus vaccinal Ankara exprimant Ag85A	Booster	II
Ad5Ag85A	Adenovirus 5 recombinant exprimant Ag85A	Booster	I
Crucell Ad35	Adenovirus 35 recombinant exprimant Ag85A, Ag85B et TB 10.4	Booster	II
<b>Vaccins protéiques</b>			
H1 + IC31	Protéine de fusion ESAT6-AG85B + adjuvant IC31	Booster	II
H4 + IC31	Protéine de fusion TB10.4-AG85B + adjuvant IC31	Booster	II
ID93 + GLA-SE	Protéine de fusion Rv2608-Rv3619-Rv3620-Rv1813 + adjuvant GLA-SE	Booster	I
H56 + IC31	Protéine de fusion Ag85B-ESAT6-Rv2660c + adjuvant IC31	Booster	II
M72 + AS01E	Protéine de fusion Mtb39a-Mtb32a + Adjuvant AS01E	Booster	II
<b>Vaccins vivants atténués</b>			
VPM1002	Souche BCG exprimant la lystériolysine et déplétée de l'uréase	Prime	II
MTBVAC	Souche <i>M.tb</i> délétée des gènes <i>phoP</i> et <i>fadD26</i>	Prime	I
<b>Vaccins inactivés</b>			
RUTI	Fragments de <i>M.tb</i> associés en liposome	Thérapeutique	II
M. Vaccae	Lysat de <i>Mycobacterium vaccae</i>	Thérapeutique	III

**Figure 4. Liste des vaccins candidats en phase clinique en 2014.** D'après Montagni et al, 2014 ; et Global tuberculosis report WHO, 2014

L'exposition des individus à des mycobactéries environnementales non-pathogènes avant la vaccination pourrait être aussi une des causes diminuant l'efficacité du BCG. Il a été démontré, dans un modèle animal, que la préexposition à des mycobactéries environnementales comme *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium scrofulaceum* ou *Mycobacterium vaccae* favorise le développement d'une réponse immunitaire limitant la multiplication du BCG et donc, son effet protecteur contre la tuberculose (Brandt et al., 2002). Les infections chroniques par des vers parasites ont aussi été mises en cause. En effet, Elias et collaborateurs ont montré chez la souris que les infections helminthiques, connues pour altérer certaines réponses lymphocytaires, réduisent sensiblement l'efficacité du BCG. De manière cohérente, les régions où l'efficacité du vaccin est faible sont caractérisées par une forte prévalence des infections dues à des vers parasites (Elias et al., 2005).

Même si plusieurs causes semblent identifiées, la variabilité d'efficacité du BCG, voire son inefficacité dans certaines régions du monde, souligne la nécessité de développer de nouvelles stratégies vaccinales.

### **c) Les nouveaux vaccins**

A ce jour, plus d'une dizaine de vaccins candidats sont en essais cliniques (**Figure 4**). On peut les classer en fonction de la stratégie vaccinale à laquelle ils répondent : les vaccins type "Prime", les vaccins type "Booster" et les vaccins thérapeutiques.

#### **i. Les vaccins type "Prime"**

Comme pour le BCG, les vaccins de type "Prime" sont des vaccins vivants atténués. Ils seraient utilisés pour vacciner les nouveaux nés et auraient pour but de protéger les personnes non encore infectées par *M.tb*. Avec un pouvoir protecteur et immunogène plus fort, leur vocation est de remplacer à terme le BCG.

Le 1<sup>er</sup> candidat est le vaccin VPM1002, issu d'une souche modifiée de BCG exprimant la lystériolysine O (LLO) de *Listeria monocytogenes*. La LLO favorise indirectement la présentation d'antigènes par les cellules ayant internalisé ce BCG recombinant pour stimuler plus efficacement les lymphocytes T CD8+. Ce vaccin modifié, contrairement au BCG classique, induit une réponse immunitaire qui ressemble davantage aux mécanismes naturels de protection contre *M.tb* (Farinacci et al., 2012; Grode et al., 2005). La souche VPM1002 porte une seconde modification, la délétion du gène codant pour l'uréase C, permettant de



potentialiser l'activité de la LLO [voir **Introduction § II, C, a), i)**]. Le VPM1002, vaccin prometteur, est actuellement le seul BCG recombinant à être entré en phase II d'essais cliniques, d'autres comme le rBCG30 ou l'AERAS-422 ont été stoppés en phase I (Leunda et al., 2014).

Le second candidat, MTBVAC, est une souche atténuée de *M.tb* délétée des gènes *phoP* et *fadD26*, codant respectivement pour un facteur transcriptionnel et une enzyme impliquée dans la biosynthèse de lipides de l'enveloppe. L'inactivation de ces gènes ne permet plus entre autre ni sécrétion d'ESAT-6, un facteur de virulence important [voir **Introduction § II, C, e)**], ni la synthèse de dimycosérosate de phtiocérol (DIM), un composé de l'enveloppe impliqué dans la protection (Camacho et al., 2001) et la virulence de la bactérie (Astarie-Dequeker et al., 2009). Ce vaccin donne une meilleure protection que le BCG chez la souris (Infante et al., 2005; Martin et al., 2006) sans aucune toxicité même administré à de fortes doses chez le cochon d'Inde (Arbues et al., 2013). Actuellement en phase I d'essai clinique, le MTBVAC est aussi un vaccin prometteur.

#### **ii. Les vaccins type "Booster"**

Contrairement au vaccin de type "Prime", l'ambition des vaccins "Booster" n'est pas de remplacer le BCG, mais plutôt de stimuler la réaction immunitaire initiale du BCG pour une protection plus longue. Ainsi, les personnes ciblées par ce type de vaccination seraient principalement les adolescents et adultes déjà vaccinés par le BCG (Global tuberculosis report WHO, 2014). Les vaccins de type "Booster" existent sous deux formes : des fusions d'antigènes injectés avec des adjuvants (vaccins protéiques) ou des vecteurs viraux non réplicatifs exprimant certains antigènes (vaccins viraux). Parmi les plus prometteurs, on peut citer le Crucell Ad35, un adénovirus recombinant incapable de se répliquer. En effet, ce vecteur viral permet la mise en place d'une réponse lymphocyte T CD8+ forte (Vogels et al., 2003) et une meilleure protection des souris contre *M.tb* (Radošević et al., 2007).

#### **iii. Les vaccins thérapeutiques**

Les vaccins thérapeutiques sont constitués de lysats mycobactériens (vaccins inactivés). Administrés à des patients atteints de tuberculose, ces vaccins ont pour but de diminuer la durée des traitements. Le premier vaccin en essai clinique est le vaccin « *M.vaccae* » qui correspond à l'injection d'une mycobactérie environnementale inactivée. L'innocuité de ce vaccin candidat est prouvée et il a été démontré qu'il permettait de stimuler





les défenses immunitaires. Cependant, plusieurs études montrent qu'il n'aurait aucun bénéfice thérapeutique [pour revue (Gröschel et al., 2014)]. Un autre vaccin thérapeutique est en cours de développement, le RUTI. Constitué de fragments de *M.tb* enveloppés dans des liposomes, ce vaccin présente des résultats encourageants sur des modèles animaux (Cardona, 2006; Guirado et al., 2008). Un essai clinique de phase III est programmé pour analyser son effet protecteur, notamment chez les personnes VIH-positive.

#### **d) La "double-vie" du vaccin BCG**

Etonnamment, quelques années après le début de l'utilisation du BCG plusieurs auteurs ont suggéré que ce vaccin posséderait également des propriétés anticancéreuses [pour revue (Gandhi et al., 2013)]. Mais il aura fallu attendre 1976 pour que les résultats des premiers essais cliniques soient publiés. Ces essais menés par Morales, un urologue, montrent que le BCG permet de réduire considérablement le risque de récurrence chez des patients atteints de cancers récurrents de la vessie (Morales et al., 1976). Cette découverte fut importante dans le domaine, puisque le cancer de la vessie est un des cancers les plus répandus (le 4<sup>ème</sup> pour les hommes et 8<sup>ème</sup> pour les femmes). Aujourd'hui, après plusieurs autres essais cliniques couronnés de succès, l'immunothérapie par le BCG s'est popularisée et est devenue une prophylaxie intéressante dans le traitement du cancer de la vessie (Lockyer and Gillatt, 2001). Le BCG pourrait être également efficace pour le traitement d'autres types de cancers, comme celui des reins ou de la prostate [pour revue (Gandhi et al., 2013)].

Bien que le bénéfice du BCG soit reconnu aujourd'hui en cancérologie, son mécanisme d'action n'est pas encore bien compris. Après l'injection du BCG par voie intravésicale, une étude suggère que les bactéries sont internalisées par les cellules cancéreuses de la vessie (Becich et al., 1991). Par la suite, des antigènes spécifiques du BCG seraient exprimés à la surface de ces cellules, stimulant le recrutement de lymphocytes T sur le site infectieux (Prescott et al., 1992), lesquels permettraient alors d'engager la destruction des cellules cancéreuses infectées par le BCG (Sapre and Corcoran, 2013).

### **C. Traitement**

#### **a) Le traitement actuel**

Antibiotique	Effet	Gènes associés à la résistance	Fonction du gène
Isoniazide	Inhibition de la synthèse des acides mycoliques	<i>inhA</i> <i>katG</i> <i>ndh</i> <i>ahpC</i>	Enoyl ACP réductase (cible de la drogue) Catalase-péroxidase (activation de la pro-drogue) NADH deshydrogénase II Alkyl hydroperoxidase
Rifampicine	Inhibition de la transcription	<i>rpoB</i>	Sous-unité $\beta$ de l'ARN polymérase (cible de la drogue)
Pyrazinamide	Inhibition de la traduction, de la <i>trans</i> -traduction et acidification du cytoplasme	<i>rpsA</i> <i>pncA</i>	Protéine ribosomale S1 (cible de la drogue) Pyrazinamidase (activation de la pro-drogue)
Ethambutol	Inhibition de la synthèse de l'arabinogalactane	<i>embCAB</i> <i>embR</i>	Arabinosyl-transférases (cibles de la drogue) Activateur transcriptionnel de <i>embCAB</i> (expression des cibles de la drogue)

**Figure 5. Les antibiotiques de 1<sup>ère</sup> ligne utilisés dans le traitement de la tuberculose.** Description et gènes associés à la résistance des antituberculeux de 1<sup>ère</sup> ligne chez *M.tb*. D'après Zumla et al, 2013 ; et Smith et al, 2013.

La thérapie actuellement recommandée pour traiter une tuberculose active dure 6 mois. Cette thérapie est divisée en deux phases successives de 2 et 4 mois. Ainsi, les 2 premiers mois consistent en la prise quotidienne par voie orale des 4 antituberculeux de 1<sup>ère</sup> ligne, l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF), la pyrazinamide (PYR) et l'ethambutol (ETB). Au cours des 4 mois suivants, seuls l'INH et la RIF sont administrés (**Figure 5**). Lorsque cette thérapie est correctement suivie, elle permet de guérir 95% des personnes malades (Zumla et al., 2013).

Malheureusement, le mauvais suivi des patients, l'administration de formules inefficaces de médicaments, la monothérapie ou encore les arrêts prématurés de traitement ont favorisé au cours des dernières décennies l'apparition de souches résistantes à ces antituberculeux (Zhang and Yew, 2009). Les gènes de *M.tb*, dont une ou plusieurs mutations sont connues pour permettre la résistance à un antibiotique de 1<sup>ère</sup> ligne, sont décrits dans la **figure 5**. Pour le traitement des tuberculoses résistantes, l'utilisation d'antibiotiques de 2<sup>nd</sup> ligne est devenue nécessaire [pour revue (Zumla et al., 2013)]. Les souches résistantes aux antibiotiques sont classées en plusieurs catégories :

- les souches multi-résistantes ou MDR (multi drug-resistant), caractérisées par la résistance à la RIF et l'INH.
- les souches ultra-résistantes ou XDR (extensively drug-resistant), caractérisées par la résistance à la RIF et l'INH mais également aux antibiotiques de la famille des fluoroquinolones (*e.g.* ofloxacin, ciprofloxacin...) et à un autre antibiotique de 2<sup>nd</sup> ligne.

Aujourd'hui, il est estimé que 3,5% des nouveaux cas de tuberculose sont dus à des souches M/XDR. Pour combattre ces souches, la thérapie est encore plus lourde. En effet, en fonction des résistances identifiées, elle peut nécessiter par exemple l'utilisation de certains antibiotiques de 2<sup>nd</sup> ligne comme la streptomycine, la kanamycine ou la capréomycine, beaucoup plus contraignants car ils ne peuvent être administrés que par voie injectable. De plus, cette thérapie est souvent génératrice d'effets indésirables et peut même interférer négativement avec d'autres traitements comme les antirétroviraux chez les personnes co-infectées avec le VIH (Onyebujoh, Ribeiro, et Whalen 2007). Enfin, le traitement d'une tuberculose résistante est très long puisqu'il nécessite jusqu'à deux ans de prise médicamenteuse. Ainsi, afin de lutter plus efficacement contre les cas de tuberculoses

Nom	Famille	Effet	Phase clinique
<b>Composés réorientés pour la lutte contre la tuberculose</b>			
Sutezolid (PNU-100480)	Oxazolidinones	Inhibition de la traduction	II
Linezolid	Oxazolidinones	Inhibition de la traduction	II
AZD-5847	Oxazolidinones	Inhibition de la traduction	II
Rifapantine	Rifamycines	Inhibition de la transcription	III
Moxifloxacin	Fluoroquinolones	Inhibition de l'ADN gyrase et de l'ADN topoisomérase	III
Gatifloxacin	Fluoroquinolones	Inhibition de l'ADN gyrase et de l'ADN topoisomérase	III
<b>Composés nouveaux pour la lutte contre la tuberculose</b>			
PA-824	Nitroimidazoles	Création d'espèces réactives nitrogénées	II
Delamanide (OPC-67683)	Nitroimidazoles	Création d'espèces réactives nitrogénées	III
SQ-109	Ethylenediamines	Inhibition de la synthèse d'acides mycoliques	II
Bedaquiline (TM-207)	Diatylquinolones	Inhibition de la synthèse d'ATP	II

**Figure 6. Liste des antibiotiques candidats en phase clinique en 2014.** D'après Montagni et al, 2014 ; et Global tuberculosis report WHO, 2014.

résistantes, il devient nécessaire de développer de nouveaux antituberculeux et/ou de nouvelles stratégies.

## **b) Les futurs traitements disponibles**

Ces dernières années, un grand nombre d'études ont été entreprises pour permettre de proposer de nouveaux traitements. Actuellement, 10 antibiotiques candidats sont en essais cliniques, qu'on peut classer en deux catégories : d'une part, les composés déjà existants et réorientés comme antituberculeux, et d'autre part, les composés nouveaux développés spécifiquement pour la lutte contre la tuberculose (**Figure 6**).

### *i. Les composés réorientés pour la lutte contre la tuberculose*

- Oxazolidinones: Il s'agit d'une famille de composés qui inhibent la synthèse protéique, en se liant à l'ARNr 23S. On y retrouve le linezolide, un antibiotique bactériostatique, efficace contre les MDR en combinaison avec d'autres drogues (Fortún et al., 2005). Cependant, son utilisation prolongée peut causer des effets indésirables importants (Sotgiu et al., 2012). Le sutezolide et l'AZD-5847, des dérivés du linezolide, sont aussi en cours d'étude car ils possèdent des activités bactéricides intéressantes (Wallis et al., 2010; Werngren et al., 2014).
- Rifamycines: La rifapantine, un dérivé de la RIF, permet également d'inhiber la transcription. Cet antibiotique est actif contre de nombreux pathogènes intracellulaires et a l'avantage de se dégrader moins rapidement. Actuellement en phase III d'essai clinique, son utilisation pourrait permettre de diminuer la durée de la thérapie (Rosenthal et al., 2007).
- Fluoroquinolones: En phase III d'essai clinique, la gatifloxacine et la moxifloxacine sont des composés qui permettraient également de raccourcir le temps de traitement (Nuermberger et al., 2004). Ils ciblent l'activité des topoisomérases de type II. Une étude a montré chez la souris que la moxifloxacine avait une efficacité similaire à celle de l'INH (Miyazaki et al., 1999), considéré actuellement, avec la RIF, comme l'antituberculeux le plus efficace.

### *ii. Les composés nouveaux développés spécifiquement pour la lutte contre la tuberculose*



- Nitroimidazoles: Cette famille regroupe deux composés à l'heure actuelle en essais cliniques: le PA-824 et le delamanide. Il s'agit de pro-drogues qui, une fois activées par l'enzyme Ddn de *M.tb*, entraînent la production d'espèces réactives nitrogénées [*e.g.* NO (Manjunatha et al., 2006)]. Bien que leur mode d'action ne soit pas précisément connu, ils inhiberaient la synthèse des acides mycoliques (Manjunatha et al., 2009), les lipides les plus abondants de l'enveloppe mycobactérienne [voir **Introduction § III, A, c), iii**]. En phase III d'essai clinique, le delamanide a récemment montré des résultats encourageants pour le traitement de tuberculoses résistantes (Skripconoka et al., 2013).
- Ethylenediamines: Parmi cette famille, le SQ-109 a montré des résultats prometteurs. Notamment, le SQ-109 possède un temps de demi-vie long et une activité bactéricide importante (Reddy et al., 2010). Ce composé agit en ciblant la protéine de transport MmpL3, ce qui a pour effet de bloquer le transport des acides mycoliques à travers la membrane plasmique (Tahlan et al., 2012).
- Diatylquinolones: Cette famille inclut la bédaquiline qui inhibe la synthèse d'ATP en ciblant l'ATP synthase de la bactérie et qui possède un pouvoir bactéricide très important [supérieur à l'INH et la RIF (Andries et al., 2005)]. Ce composé en étant 20 000 fois moins actif sur l'ATP synthase humaine que sur l'ATP synthase mycobactérienne (Haagsma et al., 2009), a l'avantage de n'être pas toxique pour l'homme. Cette molécule déjà utilisée à de nombreuses reprises pour traiter des tuberculoses résistantes, n'est pourtant qu'en phase II d'essai clinique.

### **c) Les stratégies de lutte contre la tuberculose**

Depuis 1993, la tuberculose est reconnue comme un problème majeur de santé publique. Afin de lutter plus efficacement contre cette maladie, l'OMS a lancé dès 1995 la stratégie DOTs (Directly Observed Treatment, Short-course). Cette stratégie, toujours en vigueur repose sur plusieurs piliers importants comme notamment: **(i)** le renforcement des laboratoires afin d'assurer des dépistages bactériologiques efficaces, **(ii)** un traitement normalisé avec surveillance et soutien des patients, ou **(iii)** la mise en place d'un système efficace d'approvisionnement de médicaments et de gestion pharmaceutique.

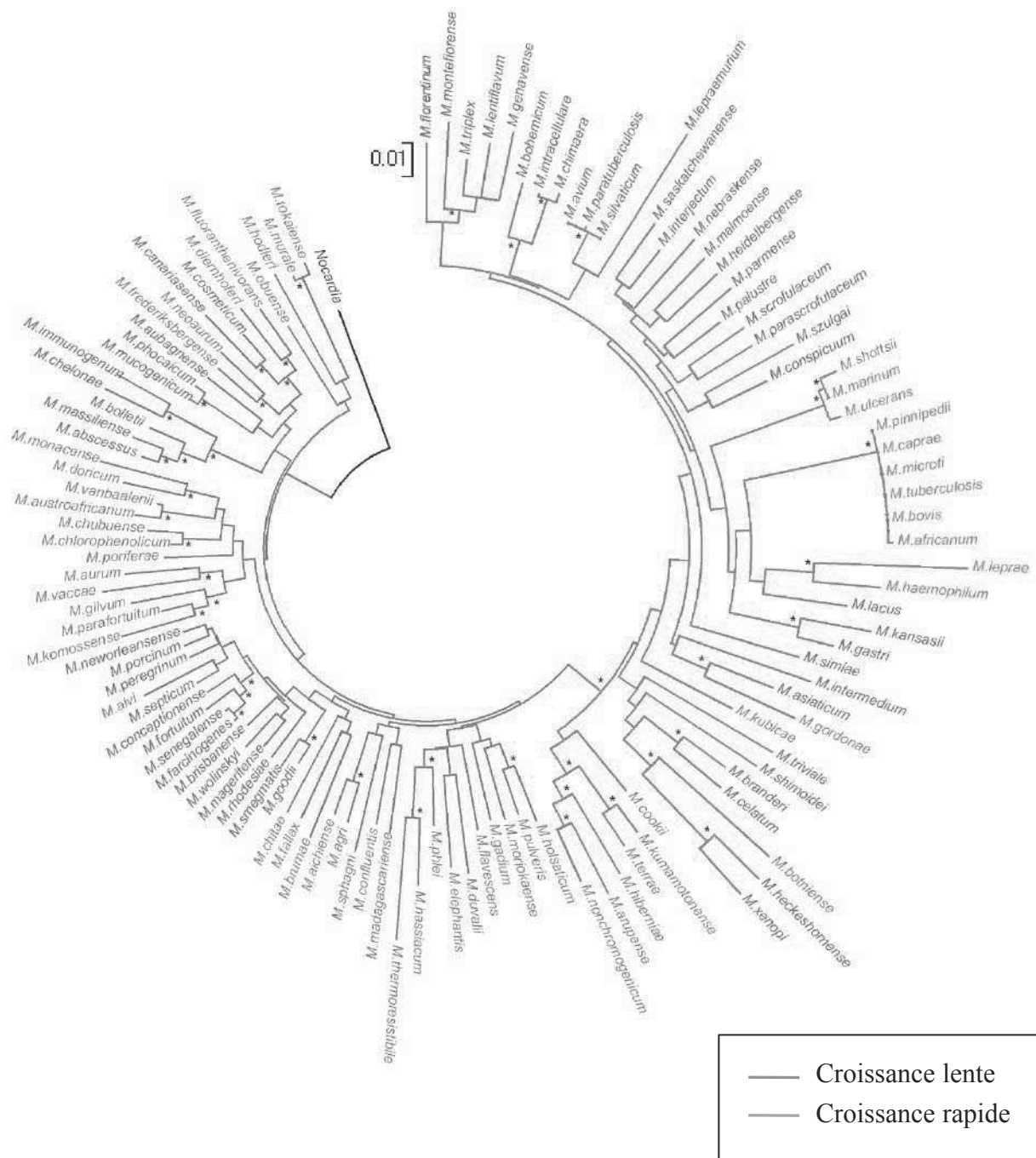
Pour renforcer cette stratégie de lutte, l'OMS a également lancé en 2006 le plan « Halte à la tuberculose » (ou Global Stop-TB). Ce plan compte de nouveaux éléments





comme par exemple : **(i)** lutter contre la co-infection Tuberculose-VIH et la prise en compte des souches M/XDR dans le traitement des patients, **(ii)** sensibiliser pour promouvoir l'implication des patients et des communautés dans la lutte contre de la tuberculose, ou encore **(iii)** favoriser la recherche pour mettre en place de nouveaux diagnostics, traitements et vaccins.

L'objectif de ces stratégies de lutte est d'éliminer la tuberculose en tant que problème de santé majeur à l'horizon 2050, c'est-à-dire de rendre le taux d'incidence de la tuberculose inférieur à 1 cas pour 1 million de personnes. Ces programmes ont permis entre 1990 et 2013 de diminuer le taux de mortalité 45%. Bien que l'évolution soit encourageante, de nombreux efforts et investissements sont encore nécessaires, notamment dans la lutte contre les tuberculoses résistantes. En effet, l'OMS estime que seulement 45% des cas de tuberculoses résistantes sont correctement diagnostiqués et pris en charge avec un traitement adapté. De plus, récemment plusieurs cas de tuberculoses résistantes à tous les antibiotiques de 1<sup>ère</sup> et de 2<sup>nd</sup> lignes ont été rapportés (Velayati et al., 2009). Les souches responsables sont dites totalement-résistantes ou TDR (Totally Drug-resistant). Bien que très rares, en étant virtuellement incurables, les tuberculoses TDR sont extrêmement inquiétantes.



**Figure 7. Arbre phylogénétique des mycobactéries.** Les espèces pathogènes strictes sont représentées en rouge, les pathogènes opportunistes en bleu, et les saprophytes en vert. Gutierrez et al, 2009.

## II. Adaptation de *Mycobacterium tuberculosis* à son hôte

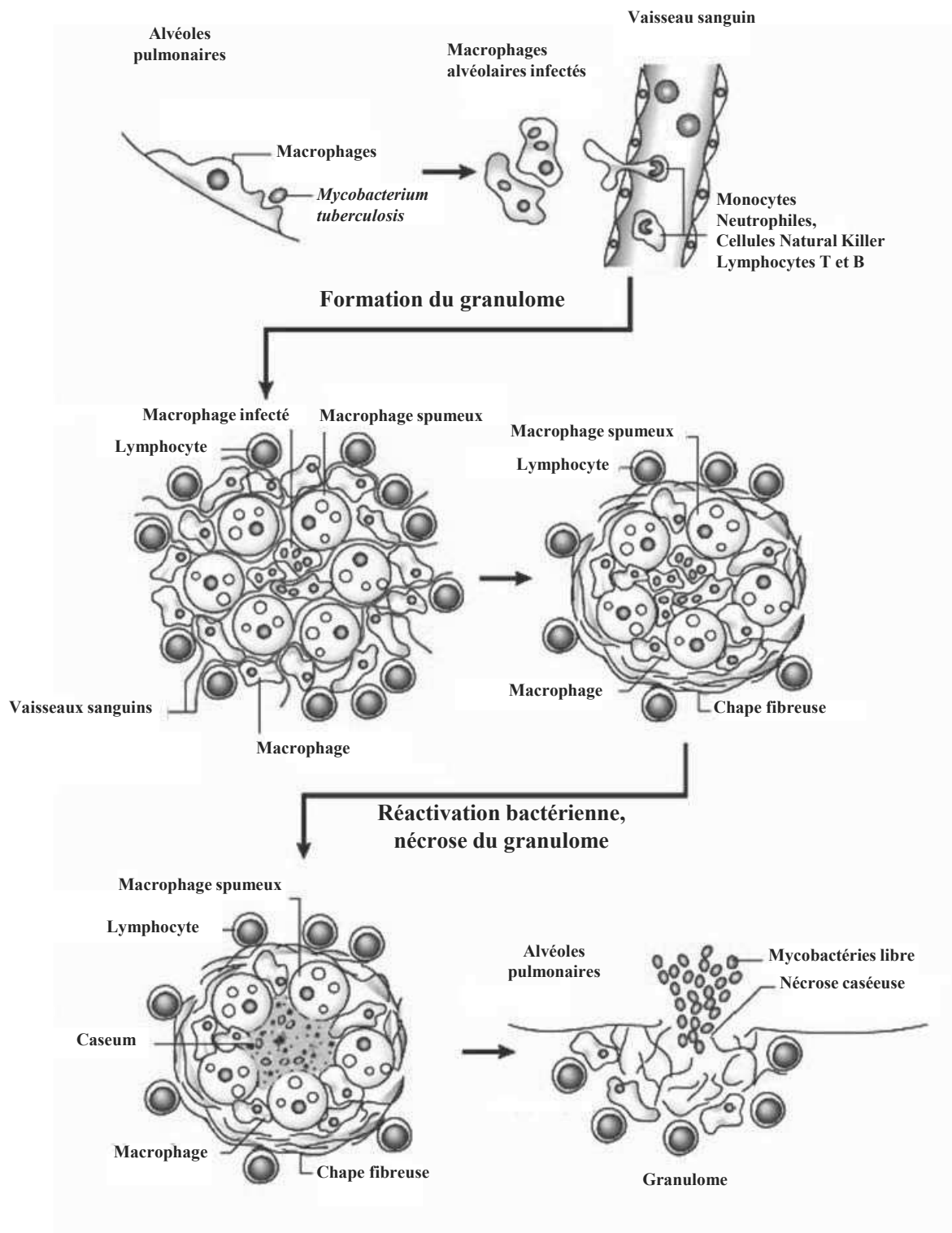
### A. Les mycobactéries

Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*, au sous-ordre des *Corynebacterineae* et classées dans la famille des *Mycobacteriaceae*, qui ne comprend que le genre *Mycobacterium*. Les actinomycètes sont caractérisées par une croissance sous forme de filaments ramifiés ressemblant à une "corde", rappelant celle des champignons. Cependant, le préfixe myco- qui signifie en latin à la fois "champignon" et "cire" fait référence pour les mycobactéries à la nature très "cireuse" de leur enveloppe. Cette enveloppe est très particulière (**voir Introduction partie III**) et confère notamment aux mycobactéries la propriété d'être résistantes à l'alcool et à des acides forts, ce qui permet de les identifier grâce à une coloration de Ziehl-Neelsen.

Les mycobactéries sont des bacilles Gram positif, non motiles, mesurant de 2 à 5 µm. Leurs génomes sont caractérisés par un fort pourcentage en G/C (de 61 à 71%), et de tailles variables d'une espèce à l'autre. Le plus petit génome mycobactérien connu est celui de *Mycobacterium leprae* [3,3Mb (Cole et al., 2001)], parfois considéré comme le "génome minimal mycobactérien". Parmi les mycobactéries, certaines espèces sont dites à croissance rapide comme *Mycobacterium smegmatis* (*M.smeg*) (3h de temps de génération), et d'autres à croissance lente comme *M.tb* ou *M.bovis* (24h de temps de génération). Aujourd'hui, on dénombre plus d'une centaine d'espèces appartenant au genre *Mycobacterium*, classées en 3 catégories : les espèces pathogènes strictes, les pathogènes opportunistes aussi appelés mycobactéries non tuberculeuses, et les saprophytes (**Figure 7**). De manière intéressante, toutes les espèces pathogènes strictes et une majorité des opportunistes sont à croissance lente, alors que les saprophytes ont plutôt une croissance rapide (Gutierrez et al., 2009). Cette observation peut laisser supposer un lien entre la vitesse de croissance et le pouvoir pathogène chez les mycobactéries.

### B. Présentation générale du cycle infectieux de *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculose se transmet entre Hommes par les voies aériennes supérieures. L'infection s'établit suite à l'inhalation de gouttelettes contenant les bactéries expectorées par

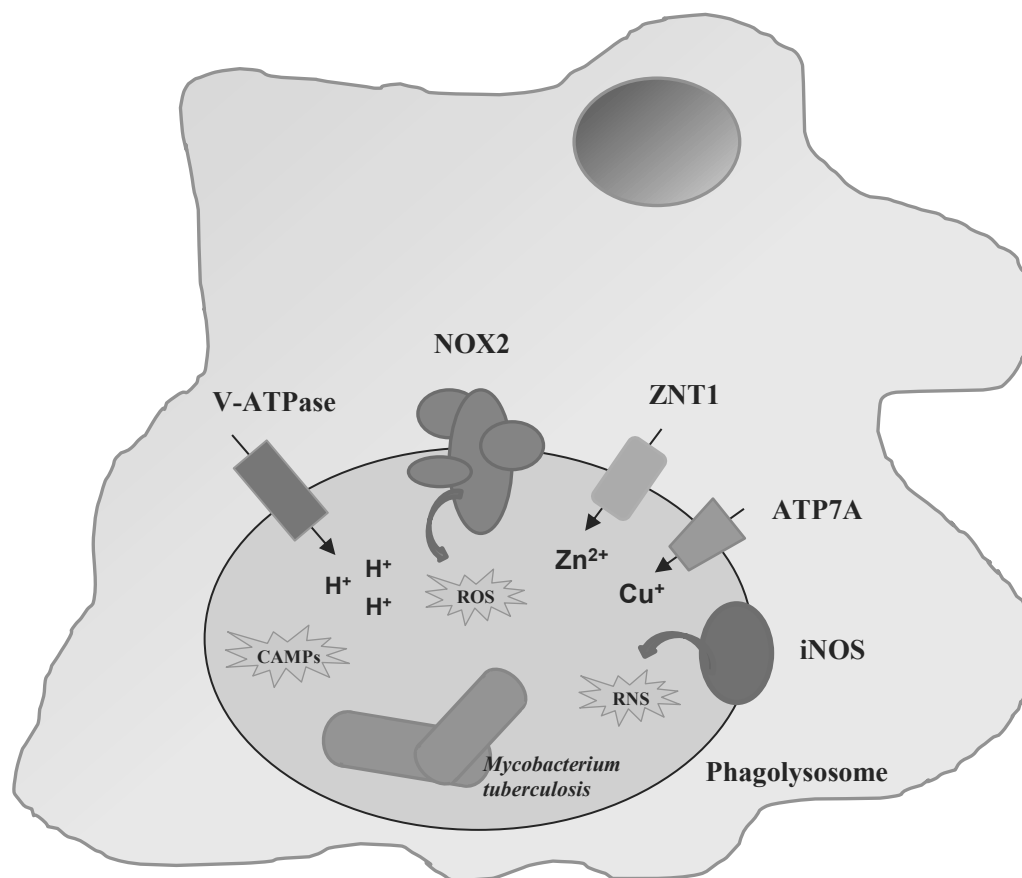


**Figure 8. Physiopathologie du cycle infectieux de *Mycobacterium tuberculosis*.** A l'intérieur des poumons, *M.tb* est reconnu et phagocyté par les cellules du système immunitaire, notamment les macrophages alvéolaires. Cela provoque une réponse inflammatoire localisée conduisant au recrutement d'autres cellules de l'immunité (lymphocytes, neutrophiles, monocytes...). Ces cellules s'organisent pour former une structure caractéristique : le granulome. Certains macrophages se différencient en macrophages spumeux, et une chape fibreuse est produite pour contenir l'infection. A ce stade, la réplication de la bactérie est stoppée et l'infection est dite latente. Mais, suite à un changement de l'état immunitaire de l'hôte (co-infection VIH, malnutrition...) la bactérie peut se « réactiver ». Les mycobactéries se multiplient, le granulome devient caséux puis se rompt. La rupture du granulome permet la libération des bactéries dans les poumons, l'individu est alors atteint de tuberculose active et devient contagieux pour son entourage. Adapté de Russell, 2007.

un individu malade. *M.tb* fait partie des agents hautement infectieux puisqu'on estime qu'une dizaine de bactéries sont suffisantes pour établir l'infection (Pfyffer, 2006).

A l'intérieur de son hôte, la bactérie rejoint les poumons dans lesquels elle est reconnue et phagocytée par des cellules du système immunitaire, notamment par les macrophages alvéolaires. De nombreuses voies d'internalisation de *M.tb* ont été mises en évidence [pour revues (Gupta et al., 2012; Schäfer et al., 2009)] et, sont classées en deux grandes catégories. On parle de phagocytose par voie opsonique lorsque les récepteurs de la cellule reconnaissent des opsonines liées à la bactérie, et de voie non-opsonique lorsque les récepteurs reconnaissent directement les antigènes bactériens. Parmi les voies non-opsoniques les plus décrites, on retrouve celles faisant intervenir les récepteurs de type lectine C, comme DC-SIGN, un récepteur se fixant entre autre au lipoarabinomannane mannosylé (ManLAM), un constituant de l'enveloppe de *M.tb* [voir **Introduction § III, A, a**]. La reconnaissance de *M.tb* par la voie opsonique est aussi très détaillée. Notamment, des protéines du complément peuvent se fixer à certaines molécules ou à des protéines exprimées à la surface de *M.tb* (e.g. Ag85C), pour ensuite être reconnues par le récepteur du complément de type 3 [CR3 ; pour revue (Velasco-Velázquez et al., 2003)]. Le CR3 est un des principaux récepteurs des macrophages.

En dépit de cette réponse immunitaire, les mycobactéries phagocytées survivent et sont même capables de se répliquer à l'intérieur des macrophages. Un macrophage peut ainsi contenir jusqu'à 20 bactéries (Park et al., 2006). La sécrétion de cytokines et de chemokines par les cellules infectées stimule le recrutement d'autres cellules de l'immunité comme les neutrophiles, les cellules Natural Killer (NK), des cellules T (CD4+ et CD8+) et des cellules B [pour revue (Russell, 2007)]. Cela provoque un remodelage du site infectieux aboutissant à la formation d'une structure multicellulaire caractéristique : le granulome (**Figure 8**). A ce stade, certains macrophages se différencient en macrophage spumeux (gorgés de vésicules lipidiques), puis une chape fibreuse constituée principalement de collagène vient délimiter la structure. Lorsque le granulome est mature, la prolifération bactérienne s'arrête et l'infection est contenue. Sans signe clinique apparent, l'individu infecté n'est à ce stade ni malade ni contagieux. Comme énoncé précédemment [voir **Introduction § I, A, a**], cette phase de latence concerne 95% des personnes infectées par *M.tb* (**Figure 2**). Lors de cette phase les bactéries sont toujours présentes, et subsistent vraisemblablement pour certaines d'entre elles dans un état dit de « dormance ». Cet état d'équilibre peut durer de nombreuses années, voire toute la vie de l'individu.



**Figure 9. Les attaques générées par le macrophage pour éliminer *M.tb*.** A l'intérieur du phagolysosome, *M.tb* est confronté au stress oxydatif, au pH acide, à l'intoxication métallique, et à la présence de peptides antimicrobiens (CAMPs). Les espèces réactives à l'azote (RNS) et à l'oxygène (ROS) sont produites respectivement par les enzymes iNOS et NOX2. Les transporteurs ZNT1 et ATP7A sont impliqués respectivement dans l'influx du zinc et du cuivre. Les pompes V-ATPase permettant l'entrée des protons  $H^+$  sont responsables de l'acidification du phagolysosome. Les CAMPs sont issus du lysosome. D'après Ehrt et Schnappinger, 2009 ; et Neyrolles et al, 2015.

Cependant, suite à un abaissement des défenses immunitaires (malnutrition, vieillissement, co-infection avec le VIH, diabète...) l'équilibre peut se briser en faveur de la bactérie. L'infection n'est plus maîtrisée : il y a réactivation. Les bactéries se répliquent activement et des lésions caséuses apparaissent au centre du granulome (**Figure 8**). Cette situation évolue jusqu'à l'effondrement du granulome avec libération des bactéries dans les tissus. L'individu est alors atteint de tuberculose active et devient contagieux pour son entourage. Les bacilles peuvent également disséminer dans l'organisme et infecter d'autres organes.

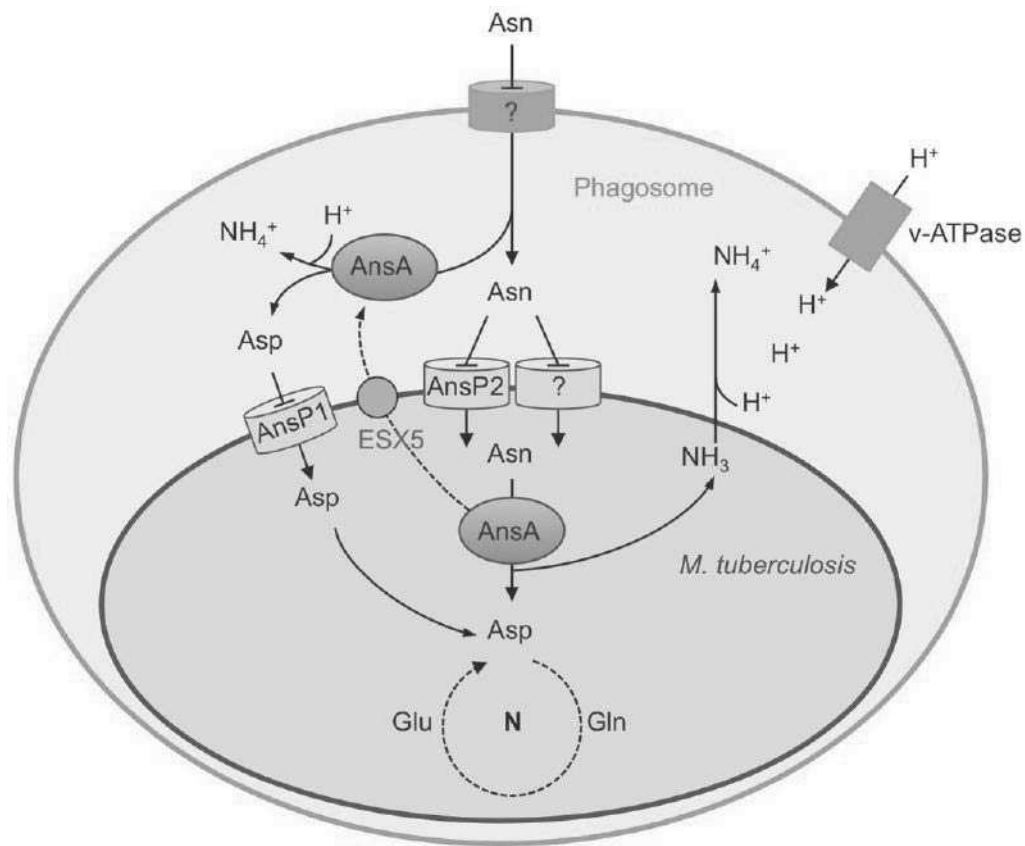
### **C. Les mécanismes de résistance de *Mycobacterium tuberculosis* face aux attaques du macrophage**

Les macrophages font partie des premières défenses de l'organisme contre les agents pathogènes microbiens. Après avoir été reconnu et phagocyté, le micro-organisme internalisé se retrouve à l'intérieur d'une vacuole appelée phagosome et sera soumis à tout un arsenal de défense du macrophage. Il sera notamment confronté à l'acidification, à des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS, respectivement), à l'intoxication à plusieurs métaux lourds ou encore à des peptides cationiques antimicrobiens (CAMPs) (**Figure 9**). Pour survivre et se répliquer, *M.tb* a développé plusieurs mécanismes de résistance [pour revues (Ehrt and Schnappinger, 2009; Gupta et al., 2012; Russell, 2011)].

#### **a) Résistance à l'acidification**

Après la phagocytose d'un micro-organisme, les phagosomes subissent un processus complexe de maturation via le recrutement séquentiel de plusieurs protéines. Ce processus s'achève par la fusion des phagosomes avec les lysosomes, devenant alors des phagolysosomes. Cette série d'évènements permet à ces vésicules d'acquérir différentes propriétés microbicides. Notamment, l'environnement devient très acide par l'accumulation de pompes V-ATPase sur la membrane du phagosome, qui permettent l'entrée de proton H<sup>+</sup> par hydrolyse de l'ATP [**Figure 9** (Russell, 2011)]. Cet environnement déjà très hostile par lui-même, permet aussi de potentialiser l'activité de différentes hydrolases lysosomales recrutées (*e.g.* protéases, lipases, phosphatases...), renforçant ainsi le pouvoir microbicide du phagosome.





**Figure 10. Rôle de l'asparaginase AnsA dans le catabolisme de l'asparagine et la résistance au stress acide.** A l'intérieur du phagosome *M.tb* est confronté à un environnement acide. L'acidification est réalisée par les pompes à protons V-ATPase recrutées sur la membrane du phagosome. Dans le phagosome, *M.tb* a accès à de l'asparagine exogène [Asn (Gouzy et al, 2014)]. L'asparagine entre dans le phagosome par un mécanisme inconnu, puis dans la bactérie en partie via le transporteur AnsP2. L'asparagine est hydrolysée par l'enzyme AnsA, ce qui produit de l'aspartate (Asp) et de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). AnsA est une protéine qui peut être sécrétée dans la lumière du phagosome via le système ESX-5. L'aspartate est importé par le transporteur AnsP1 (Gouzy et al, 2013) et est assimilé dans le métabolisme central de l'azote (N), ce qui permet la synthèse de glutamate (Glu) et de glutamine (Gln). L'ammoniac libéré se complexe avec les protons de la lumière du phagosome pour donner de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), favorisant l'alcalinisation de l'environnement de *M.tb*. D'après Gouzy et al, 2014.

Ce processus d'acidification est très rapide : en moins de 20 min le pH chute à 4,8-5 (Yates et al., 2005). Cependant, *M.tb* a élaboré plusieurs mécanismes pour contrer cette acidification et rester dans un environnement seulement légèrement acide (pH de l'ordre de 6,2 à 6,4).

*i.* Neutralisation du pH acide par la production d'ammoniac

Une étude récente a mis en évidence qu'une enzyme impliquée dans le catabolisme et l'utilisation de l'asparagine chez *M.tb*, l'asparaginase AnsA, participe à la résistance de la bactérie au stress acide [Figure 10 (Gouzy et al., 2014a)]. AnsA est une protéine sécrétée dont l'activité permet à *M.tb* de neutraliser le pH acide via la production d'ammoniac. En effet, AnsA en hydrolysant l'asparagine génère de l'aspartate et de l'ammoniac (NH<sub>3</sub>). Or, l'ammoniac est une base faible qui en se complexant avec des protons H<sup>+</sup> va former de l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et ainsi favoriser l'augmentation du pH. Donc, à travers AnsA, *M.tb* a su coupler un besoin nutritionnel essentiel, l'apport d'azote par assimilation de l'aspartate et de l'asparagine avec une stratégie de résistance au stress acide au cours de l'infection [Figure 10 (Gouzy et al., 2013, 2014a, 2014b, 2014c)].

L'hydrolyse de l'urée par l'uréase mycobactérienne UreC permet également de produire de l'ammoniac. De la même manière, cette enzyme participe à l'alcalinisation du phagosome (Lin et al., 2012). Il est à noter que chez le candidat vaccin VPM1002, la déplétion de cette uréase permet aussi de potentialiser l'effet de la lystériolysine O (LLO) [voir Introduction § I, B, c), i], car l'activité de la LLO est plus importante à pH acide (Grode et al., 2005).

*ii.* L'inhibition de la fusion phagosome-lysosome

Lors de l'infection, *M.tb* a la capacité d'antagoniser les processus de maturation et de fusion du phagosome avec le lysosome (Mwandumba et al., 2004; Sturgill-Koszycki et al., 1994). Certains composés de l'enveloppe mycobactérienne comme le ManLAM ou le dimycolate de tréhalose (TDM) sont notamment impliqués. Le ManLAM, en s'intercalant dans la membrane du phagosome, inhibe l'activité de la protéine VPS34, limitant ainsi l'accumulation de phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) (Fratti et al., 2001; Welin et al., 2008). Or le PI3P est nécessaire à l'acquisition de la protéine EEA1, elle-même nécessaire au recrutement de la protéine Rab7, une GTPase très importante à la fusion phagosome-



lysosome. Le TDM, un autre lipide de l'enveloppe, joue aussi un rôle important dans l'inhibition de la fusion phagosome-lysosome (Indrigo et al., 2003; Katti et al., 2008), mais le mécanisme par lequel le TDM agit, n'est pas encore connu.

En plus de ces composés de l'enveloppe, *M.tb* sécrète deux protéines prenant part à l'inhibition de la maturation du phagosome : PknG et SapM. PknG, une protéine de type sérine/thréonine kinase (STPK), pourrait accéder au cytoplasme du macrophage infecté pour modifier l'activité de protéines de l'hôte impliquées dans la maturation du phagosome en les phosphorylant (Walburger et al., 2004). SapM est une phosphatase à lipide. Une fois sécrétée, SapM est capable d'hydrolyser le PI3P de la membrane phagosomale, limitant le recrutement de EEA1, conduisant, en définitive, à l'inhibition de la fusion phagosome-lysosome (Vergne et al., 2005).

## **b) Résistance aux espèces réactives de l'oxygène et de l'azote**

Après la phagocytose, le micro-organisme internalisé est confronté à un stress oxydatif dû à différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). Celles-ci sont produites respectivement par deux enzymes assemblées au niveau de la membrane du phagosome : la NOX2 (NADPH phagocyte oxidase) et l'iNOS (inducible nitric oxide synthase) (**Figure 9**). Le complexe NOX2 permet de générer des anions super-oxides ( $O_2^-$ ), capables de se dismuter pour donner ensuite du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et des radicaux hydroxyles [ $HO^\bullet$ , (Bedard and Krause, 2007)]. L'iNOS produit du monoxyde d'azote (NO), un composé capable d'interagir avec notamment les anions super-oxides pour former du peroxynitrite [ $OONO^-$ , (Beckman et al., 1990)]. Tous ces ROS et RNS peuvent réagir avec un grand nombre de molécules, comme les acides nucléiques, les protéines ou les lipides, d'où leur très forte toxicité pour le micro-organisme phagocyté. Pour se protéger de ces stress oxydatifs, *M.tb* a adopté plusieurs stratégies: la détoxification, la réparation des dommages causés ou encore la dégradation des biomolécules affectées.

### **i. Résistance au stress oxydatif par la détoxification**

*M.tb* code pour de nombreuses enzymes lui permettant de réduire l'effet toxique des ROS et RNS. La superoxide dismutase SodA catalyse la conversion des anions superoxides en  $H_2O_2$ , qui peut ensuite être décomposé en eau et en oxygène par la catalase peroxidase KatG. Ces deux enzymes sont sécrétées par *M.tb* et jouent un rôle particulièrement important



dans la résistance au stress oxydatif dans des cultures *in vitro*. De même, leur implication dans la virulence du bacille a été démontrée (Edwards et al., 2001; Ng et al., 2004). D'autres enzymes sont importantes à *M.tb* pour lutter contre le stress oxydatif. Il y a notamment l'enzyme AhpC, une peroxidoxine qui permet à la bactérie de se détoxifier du peroxinitrite en le convertissant en nitrite (Bryk et al., 2000). AhpC participe aussi à la résistance à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De manière cohérente, l'inactivation du gène *ahpC* se traduit par une diminution importante de la virulence (Wilson et al., 1998).

Pour se protéger de certains stress, dont le stress oxydant, de nombreuses bactéries synthétisent des thiols de petits poids moléculaires (Masip et al., 2006). Le glutathion, un tripeptide comportant un thiol, est connu pour son rôle antioxydant important chez les cyanobactéries et les protéobactéries. Les mycobactéries ne produisent pas de glutathion, mais un analogue, le mycothiol. A l'instar du glutathion, le mycothiol participe à la résistance au stress oxydatif des mycobactéries *in vitro* (Newton et al., 2008). Cependant, la production de mycothiol n'est pas indispensable pour la virulence de *M.tb*, suggérant que d'autres mécanismes pourraient compenser l'absence de mycothiol pendant l'infection (Vilchèze et al., 2008).

**ii. Résistance au stress oxydatif par la réparation des dommages et la dégradation des biomolécules affectées**

*M.tb* a développé plusieurs mécanismes pour réparer ses biomolécules endommagées par des ROS ou des RNS [pour revue (Ehrt and Schnappinger, 2009)]. Par exemple, la protéine UvrB, impliquée dans la réparation de l'ADN, contribue à la résistance au stress oxydatif et à la virulence chez la souris (Darwin and Nathan, 2005). Alternativement, la virulence d'une souche de *M.tb* délétée du gène *uvrB* est similaire à celle d'une souche *Wt* dans des souris mutées pour NOX2 et iNOS. Ces données soulignent l'importance de la réparation de l'ADN dans la résistance de *M.tb* aux ROS et RNS lors de l'infection (Darwin and Nathan, 2005).

*M.tb* possède également des mécanismes pour prévenir l'action mutagène des ROS. Des expériences *in vitro* suggèrent que la protéine de type histone Lsr2, en se fixant sur l'ADN, formerait une barrière physique autour du chromosome, le protégeant ainsi des molécules d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Colangeli et al., 2009). Cette protection physique est importante puisque la délétion du gène *lsr2* augmente la sensibilité à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et affecte sensiblement la survie de *M.tb* chez la souris (Bartek et al., 2014).



Le protéasome, un complexe multi-protéique intervenant dans la dégradation des peptides, participe aussi à la résistance de *M.tb* au stress oxydatif, en particulier au RNS (Darwin et al., 2003; Gandotra et al., 2007). Les protéines PrcA et PrcB, qui font partie du « cœur protéolytique » du protéasome, jouent un rôle important dans cette résistance et contribuent aussi à la pathogénicité de *M.tb* (Gandotra et al., 2007). Deux hypothèses non mutuellement exclusives peuvent expliquer l'effet protecteur du protéasome: **(i)** il pourrait permettre de dégrader les protéines endommagées par les RNS, potentiellement toxiques pour la bactérie ; **(ii)** ou assurer la dégradation de répresseurs transcriptionnels de gènes impliqués dans la détoxification (Butler et al., 2006).

### **c) Résistance à l'intoxication au cuivre et au zinc**

A l'intérieur du phagosome, *M.tb* est aussi confronté à de grande quantité de cuivre et de zinc, deux métaux toxiques à forte concentration (Botella et al., 2011; Wolschendorf et al., 2011). L'influx de ces métaux du cytosol vers le phagosome est réalisé par les transporteurs ZNT1 (pour le zinc) et ATP7A (pour le cuivre) [Figure 9 ; pour revue (Neyrolles et al., 2015)]. Pour lutter contre cette intoxication métallique, le bacille tuberculeux dispose de pompes d'efflux permettant d'exporter l'excès de métal. La protéine membranaire CptV permet probablement d'exporter le cuivre (Ward et al., 2010). Bien que ce transporteur soit impliqué dans la résistance de *M.tb* à de fortes concentrations de cuivre, la délétion du gène *cptV* n'a pas d'effet sur la virulence. Une autre protéine membranaire, MctB, participe à la résistance au cuivre de la bactérie en limitant son accumulation, mais un rôle direct de MctB dans l'export du cuivre n'a pas été clairement établi. Cependant, MctB est importante à la virulence de *M.tb* dans plusieurs modèles infectieux (Wolschendorf et al., 2011). Enfin, la pompe d'efflux CptC permet à la bactérie d'exporter le zinc. Un mutant de *M.tb* délété du gène *cptC* est hypersensible au  $Zn^{2+}$ , mais a aussi une croissance altérée à l'intérieur des macrophages (Botella et al., 2011).

### **d) Résistance aux peptides cationiques antimicrobiens**

Au cours de l'infection, le micro-organisme internalisé par les cellules immunitaires est aussi susceptible d'être confronté à l'activité microbicide des peptides cationiques antimicrobiens ou CAMPs [pour revue (Padhi et al., 2014)]. Ce sont des petits peptides chargés positivement qui, généralement, induisent la lyse du micro-organisme capturé en déstabilisant son enveloppe, qui est, à l'inverse, chargée négativement. Plusieurs données





suggèrent que les CAMPs jouent un rôle protecteur important lors d'infections mycobactériennes. Il y a notamment la cathélicidine LL-37 et la défensine hBD2 dont l'activité bactéricide permet de restreindre la croissance de *M.tb* dans les macrophages (Kisich et al., 2001; Sonawane et al., 2011). De manière intéressante, la synthèse de ces deux CAMPs est stimulée par la fixation de la vitamine D à un récepteur spécifique du macrophage (Liu et al., 2007; Nickel et al., 2012). Ce mécanisme explique en partie l'effet protecteur de la vitamine D contre la tuberculose [pour revue (Bruns and Stenger, 2014)], et par conséquent le bénéfice de l'exposition au soleil décrit depuis déjà plus d'un siècle pour le traitement de cette maladie (Weinzirl, 1906).

Pour se protéger des CAMPs, certains microorganismes réduisent la charge négative de leur enveloppe, diminuant ainsi l'affinité de ces peptides cationiques à celle-ci (Peschel and Sahl, 2006). La membrane plasmique de *M.tb* contient un lipide chargé positivement : le phosphatidyl glycérol lysinilé (L-PG). La synthèse de ce lipide requiert en outre la lysine transferase LysX (Maloney et al., 2009). De manière intéressante, un mutant de *M.tb* délété du gène *lysX*, incapable de produire du L-PG, est plus sensible à un CAMP spécifique (la défensine HNP-1). Ce phénotype est directement corrélé à une altération du potentiel membranaire du mutant. De même, ce mutant est atténué chez la souris et le cochon d'Inde, soulignant le rôle crucial de LysX dans la protection du pathogène contre les défenses de l'hôte et pour sa virulence (Maloney et al., 2009).

### **e) La résistance par la fuite : l'échappement du phagosome**

La stratégie la plus évidente mise en place par *M.tb* pour se protéger des différentes attaques lancées par le macrophage est probablement de s'échapper du milieu intraphagosomal vers le cytosol. Cette théorie de l'échappement de *M.tb* a été pour la 1<sup>ère</sup> fois proposée en 2007 (van der Wel et al., 2007) et soutenue par d'autres travaux (Houben et al., 2012; Simeone et al., 2012). D'après ces études, le système de sécrétion ESX-1 aurait un rôle central dans le processus de translocation de *M.tb* du phagosome vers le cytosol. Ce système permet, en outre, la sécrétion des protéines antigéniques ESAT-6 (6kDa early secreted antigenic target) et CFP-10 (10 kDa culture filtrate protein). ESAT-6, connue pour son activité lytique sur les membranes biologiques, pourrait être responsable de la perforation de la membrane phagosomale favorisant ainsi la libération de *M.tb* dans le cytosol (Gao et al., 2004; van der Wel et al., 2007). Bien que ce processus ait été décrit par plusieurs groupes, d'autres équipes n'ont pas réussi à reproduire les résultats pour le confirmer. Pour cette raison,



la théorie de l'évasion de *M.tb* du phagosome reste encore largement débattue dans la communauté scientifique (Fortune and Rubin, 2007; Harriiff et al., 2012; Molloy, 2012; Welin and Lerm, 2012).

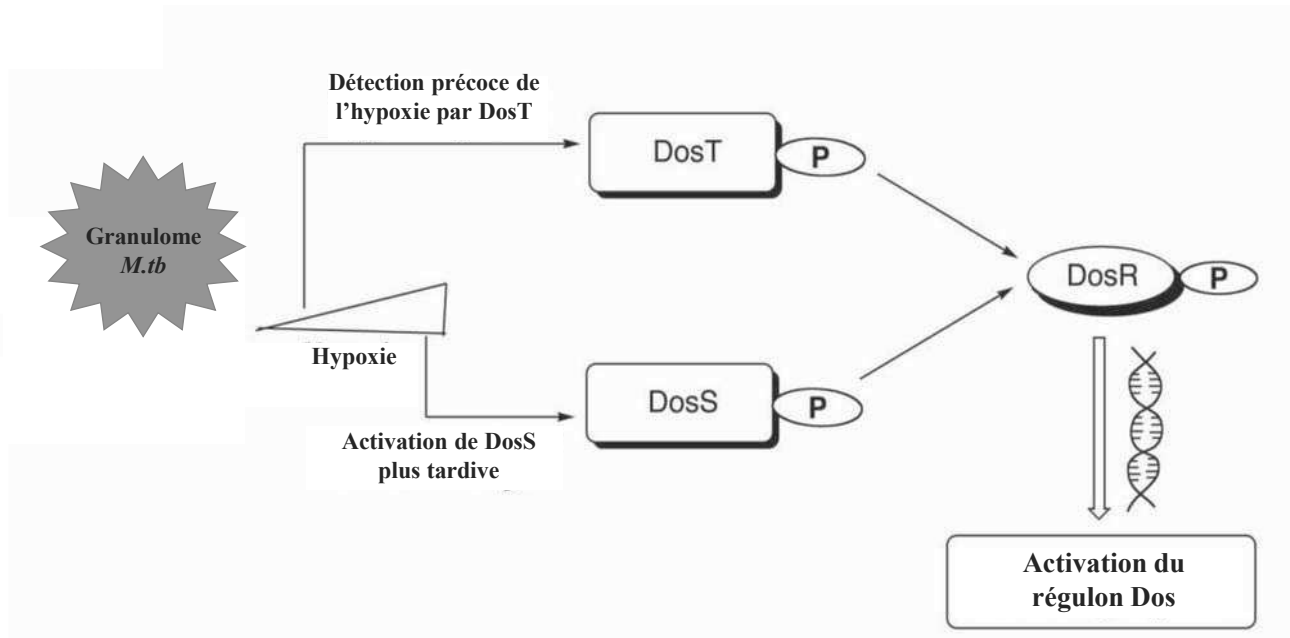
## **D. Les mécanismes de régulation impliqués dans la survie à long terme de la bactérie**

Une des particularités les plus importantes de *M.tb* est sa capacité à subsister à l'intérieur de son hôte pendant de nombreuses années. Contenue par le système immunitaire à l'intérieur du granulome, la bactérie est considérée dans un état de "dormance". L'hôte ne développe pas de signes cliniques de la maladie, l'infection est dite « latente ». L'état de dormance se caractérise chez la bactérie par une activité métabolique très faible et une non-réplication ou une très faible réplication (Gengenbacher and Kaufmann, 2012). Ces bactéries présentent également une tolérance accrue à de nombreux antibiotiques. Il est proposé que certains stress rencontrés par *M.tb* au sein du granulome, en particulier l'hypoxie et la limitation de l'accès aux nutriments, permettent de déclencher la transition de l'état métabolique actif à l'état de dormance (Gengenbacher and Kaufmann, 2012). Cette hypothèse est appuyée par plusieurs études montrant que la bactérie, en réponse à la carence en nutriments ou la déplétion en oxygène *in vitro*, diminue son activité métabolique (faible concentration en ATP), entre dans un état de non-réplication (Gengenbacher et al., 2010; Rao et al., 2008), et devient hautement tolérante à plusieurs antibiotiques (Gengenbacher et al., 2010; Gomez and McKinney, 2004; Sarathy et al., 2013; Wayne and Sohaskey, 2001; Xie et al., 2005).

*M.tb* possède plusieurs systèmes lui permettant de percevoir l'environnement et d'engager une reprogrammation génétique pour entrer dans cet état de "dormance", indispensable pour persister à long terme dans son hôte.

### **a) Le système DosR/ST**

Dénommé Dos pour Dormancy Survival, le système DosR/ST est considéré comme fondamental pour l'établissement de l'état de dormance. Il s'agit d'un système de transduction de signal à deux composants (STS) constitué de deux histidines kinases, DosS et DosT, et d'un régulateur de réponse transcriptionnel, DosR. DosT et DosS sont deux senseurs activés par l'hypoxie, mais répondent également à la présence de monoxyde de carbone (CO) et



**Figure 11. Représentation schématique du fonctionnement du système à deux composants DosR/ST en réponse à l'hypoxie au sein du granulome.** Les senseurs DosT et DosS perçoivent la diminution de la concentration en dioxygène. DosT intervient précocement lors de la transition de l'aérobiose à l'hypoxie, et DosS plus tardivement. La détection du signal induit l'autophosphorylation de DosT et DosS, qui transfèrent ensuite leur groupement phosphoryl au régulateur DosR. Une fois phosphorylée, DosR est capable de se fixer à l'ADN et d'activer l'expression des gènes de son régulon. Adapté de Sivaramakrishnan & Ortiz de Montellano 2013.

d'oxyde nitrique (NO) dans l'environnement (Cho et al., 2009; Kumar et al., 2007; Shiloh et al., 2008). DosT est davantage sensible à l'hypoxie et y répond de manière plus forte que DosS (Kim et al., 2010). DosT interviendrait dans la mise en place de la réponse adaptative au stress hypoxique, alors que DosS permettrait de maintenir cette réponse [Figure 11 (Honaker et al., 2009; Kim et al., 2010; Sivaramakrishnan and Ortiz de Montellano, 2013)].

Suite à la perception du signal, les deux kinases DosT et DosS s'autophosphorylent au niveau d'une histidine conservée. Elles transfèrent ensuite le groupement phosphoryl de l'histidine sur un résidu aspartate du régulateur de réponse DosR induisant l'activation de celui-ci [Figure 11 (Roberts et al., 2004)]. La déplétion en oxygène modifie rapidement l'expression de plus de 100 gènes chez *M.tb* (Rustad et al., 2009; Sherman et al., 2001), parmi lesquels une 50<sup>aine</sup> sont induits exclusivement par DosR [dont *dosR* et *dosS* (Park et al., 2003; Voskuil et al., 2004)]. De manière intéressante, le NO, un stress également perçu par DosS et DosT permet d'activer le même régulon (Voskuil et al., 2003). La délétion du gène *dosR* provoque une forte diminution de la survie de la souche BCG de *M.bovis* en condition hypoxique (Boon and Dick, 2002). Des résultats similaires ont été obtenus avec un mutant *dosR* de *M.tb*, soulignant le rôle essentiel du régulon Dos dans l'adaptation de la bactérie au stress hypoxique (Leistikow et al., 2010). La fonction de la majorité des gènes du régulon Dos n'est pas encore connue, cependant, parmi ceux dont la fonction est connue ou prédite, plusieurs pourraient jouer un rôle dans l'adaptation à l'hypoxie (Rustad et al., 2009).

## ❖ NarK2

En l'absence d'oxygène, certaines bactéries sont capables d'utiliser un accepteur final d'électrons autre que l'O<sub>2</sub> pour maintenir leur chaîne respiratoire active. Ainsi, *M.tb* peut réduire les nitrates en nitrites en condition hypoxique (Sohaskey, 2008; Wayne and Hayes, 1998). Ceci suggère qu'en l'absence d'O<sub>2</sub>, *M.tb* pourrait utiliser les nitrates comme accepteur final d'électrons. La respiration des nitrates semble contribuer à la virulence de la bactérie, puisqu'un mutant de *M.bovis* BCG, incapable de réduire les nitrates, est sensiblement atténué chez la souris (Weber et al., 2000). De manière intéressante, le gène *narK2* codant pour un transporteur des nitrates appartient au régulon Dos. NarK2 est un transporteur très conservé qui, en capturant le nitrate exogène (Giffin et al., 2012), va permettre la stimulation de l'activité nitrate réductase en condition hypoxique (Sohaskey, 2005; Sohaskey and Wayne, 2003). Cependant, le rôle de NarK2 dans la dormance ou la virulence de *M.tb* n'a pas encore été évalué.



### ❖ Tgs1

En condition hypoxique, le métabolisme des lipides de *M.tb* est profondément modifié. La biosynthèse de la plupart des lipides de l'enveloppe est réprimée, contrairement à la biosynthèse des triacylglycérols (TAGs) qui est fortement induite (Galagan et al., 2013). Le rôle des TAGs chez *M.tb* n'est pas encore bien compris, mais ces lipides seraient une source d'énergie importante pour la survie des bactéries en dormance. *M.tb* possède 15 gènes codant des triacylglycérols synthases [*tgs* (Daniel et al., 2004)], dont seul *tgs1* appartient au régulon Dos. De manière cohérente, Tgs1 joue un rôle fondamental dans la production des TAGs en condition de dormance, puisqu'un mutant *tgs1* de *M.tb* n'accumule plus de TAGs (Sirakova et al., 2006). Cependant, la contribution de Tgs1 dans le maintien de la dormance et la virulence de *M.tb* reste à être évaluée.

### ❖ Rv0079, HspX et Rv2623

Les gènes *rv0079*, *hspX* ou *rv2623*, dont l'expression est induite par DosR pourraient être impliqués dans la dormance de *M.tb*. Rv0079 est une protéine régulatrice pouvant inhiber la synthèse protéique, en se liant probablement à la sous unité 30S du ribosome. Cette inhibition permettrait de diminuer la vitesse de croissance, favorisant ainsi l'entrée en dormance (Kumar et al., 2012). Les gènes *hspX* et *rv2623* font partie des gènes les plus induits par le régulateur DosR. HspX possède une fonction de chaperon moléculaire (Fu and Chang, 2004; Valdez et al., 2002), tandis que Rv2623 est prédit pour être une « Universal Stress Protein ». Un mutant de *M.tb* délété de *hspX* est hypervirulent chez la souris, c'est-à-dire qu'il se multiplie plus vite que la souche *Wt* (Hu et al., 2006; Stewart et al., 2006). Inversement, la surexpression de *hspX* diminue la vitesse de croissance de *M.tb in vitro* (Hu et al., 2006). Des phénotypes similaires ont été observés chez une souche  $\Delta$ *rv2623* et une souche surexprimant *rv2623* (Drumm et al., 2009). Ainsi, ces études suggèrent que les protéines HspX et Rv2623 en contrôlant la croissance bactérienne, pourraient favoriser la persistance à long terme de la bactérie (Chao and Rubin, 2010; Drumm et al., 2009; Hu et al., 2006).

### ❖ Rv0081

Le régulon Dos comprend également un régulateur transcriptionnel : Rv0081. L'identification par Chip-Seq des cibles de plus de 150 régulateurs transcriptionnels de *M.tb*, combinée à l'analyse des données d'expression après l'induction de ces mêmes régulateurs, ont permis de reconstruire *in silico* un réseau de régulation complexe (Galagan et al., 2013; Minch et al., 2015). Rv0081 serait un point central de ce réseau, permettant d'intégrer et de coordonner





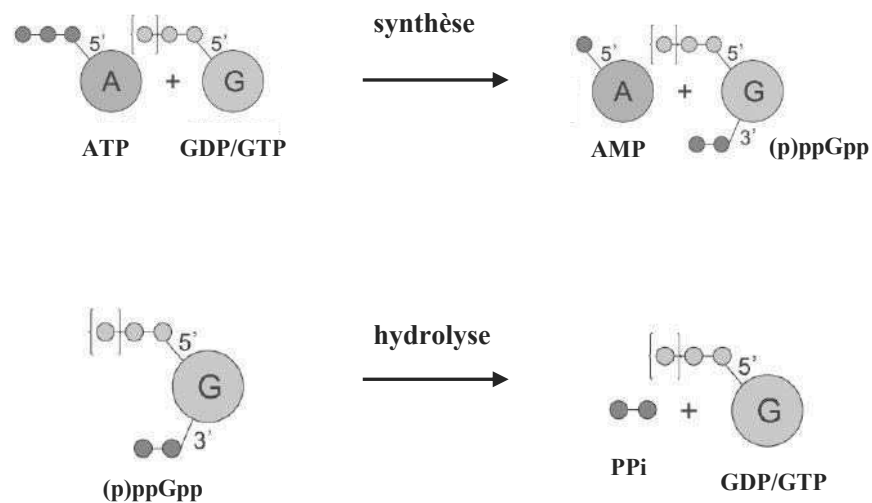
différentes fonctions cellulaires comme par exemple, la biosynthèse et le catabolisme des lipides. Par ailleurs, Rv0081 est prédit comme étant un régulateur global, contrôlant l'expression de plusieurs centaines de gènes, et qui permettrait avec DosR d'initier la réponse adaptative à l'hypoxie (Galagan et al., 2013). Il n'existe cependant aucune donnée expérimentale sur le rôle physiologique de Rv0081 à l'heure actuelle.

Le système DosR/ST est considéré, depuis sa découverte, comme fondamental afin d'engager la reprogrammation génétique nécessaire à *M.tb* pour persister à long terme. Cependant, son rôle dans la virulence n'est pas très clair, ce qui soulève des questions quant à son implication réelle dans le développement et le maintien de l'état de dormance de la bactérie à l'intérieur de son hôte (Chao and Rubin, 2010; Rustad et al., 2009). En effet, il y a des données contradictoires sur le comportement des mutants *dos* lors du processus infectieux. Un mutant *dosR* peut être hypervirulent sur un modèle souris (Parish et al., 2003), ou ne présenter aucun phénotype dans plusieurs souches de souris testées, même si l'expression des gènes du régulon Dos est altérée (Rustad et al., 2009). Un phénotype atténué pour un mutant *dosR* a également été rapporté sur les modèles cochon d'Inde et souris (Converse et al., 2009). Par ailleurs, la lignée W-Beijing de *M.tb* qui est une famille de souches surexprimant de manière constitutive le régulon Dos, ne semble pas être davantage susceptible d'entrer en dormance à l'intérieur de l'hôte (de Jong et al., 2008). Bien que ces différents résultats puissent résulter de différences dans les conditions expérimentales utilisées [souches différentes de *M.tb*, type de mutation et/ou du modèle infectieux utilisé ; (Bretl et al., 2011)], il est clair que des études supplémentaires sont nécessaires pour caractériser précisément le rôle biologique des différents membres du régulon Dos. Mais surtout, il est important de mieux comprendre la contribution de ce STS dans la pathogénicité de *M.tb*, pour évaluer précisément son rôle dans les tuberculoses latentes.

## **b) La réponse stringente**

### **i. La réponse stringente et l'adaptation des bactéries aux stress environnementaux**

La réponse stringente (RS) est un mécanisme d'adaptation universellement conservé. La RS est induite par l'accumulation d'une alarmone : le (p)ppGpp [(guanosinetetraphosphate ou pentaphosphate (Cashel and Gallant, 1969)]. La production de cette alarmone est activée par la carence en acides aminés, mais aussi par d'autre stress (*e.g.* carence en phosphate, en



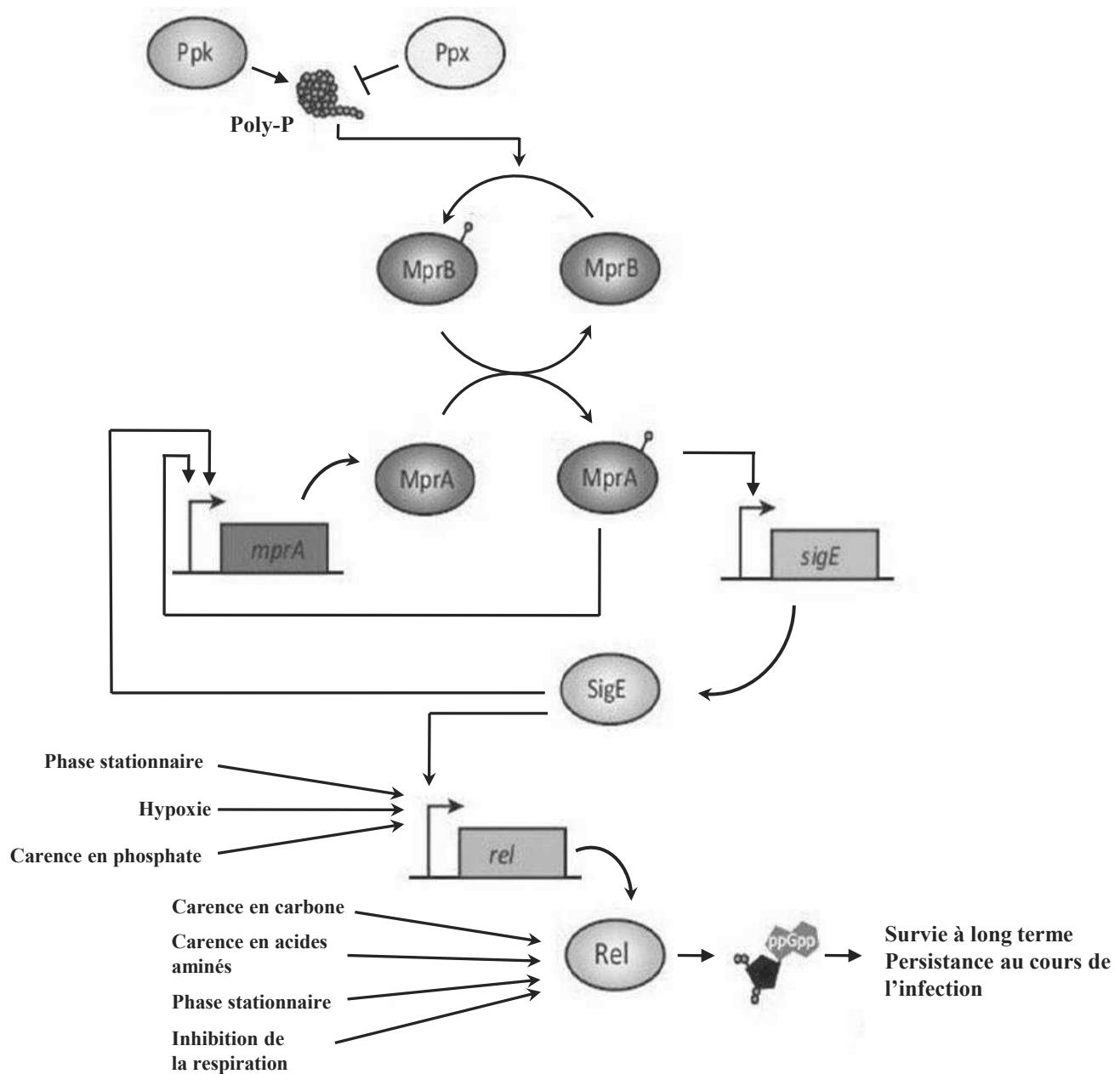
**Figure 12. Représentation schématique de la synthèse et de l'hydrolyse du (p)ppGpp.** A et le G représentent respectivement l'adénosine et la guanosine. Les phosphates sont matérialisés par les petits cercles. D'après Jain et al, 2005.

fer, en acides gras). Le (p)ppGpp est un second messenger initiant une reprogrammation génétique rapide pour permettre aux bactéries de s'adapter au stress. L'accumulation du (p)ppGpp a pour conséquence la répression de la synthèse des ARNs stables (ARNt et ARNr), des protéines ribosomales, de l'ADN, et donc, *in fine*, l'arrêt de la croissance (Svitil et al., 1993). En parallèle, le (p)ppGpp stimule la production de facteurs nécessaires à l'adaptation au stress, comme par exemple certaines enzymes de biosynthèse d'acides aminés. Selon l'espèce bactérienne, la RS est impliquée dans des programmes de différenciation comme la sporulation, la formation de biofilm, la persistance à long terme ou dans des processus comme la production d'antibiotiques, le quorum sensing et la virulence [pour revue (Jain et al., 2006a)].

Le (p)ppGpp exerce son activité par différents mécanismes. Il agit tout d'abord au niveau transcriptionnel en modifiant l'expression de plusieurs centaines de gènes. Ce contrôle de l'expression génique peut s'exercer, via l'interaction directe, entre l'alarmone et l'ARN polymérase comme chez *Escherichia coli* (*E.coli*) [pour revue (Potrykus and Cashel, 2008)], ou alors de manière indirecte, en altérant les concentrations relatives des différents NTPs initiateurs comme chez *Bacillus subtilis* et probablement d'autres Gram positifs [pour revue (Turnbough, 2008)]. Le (p)ppGpp peut également agir au niveau post-traductionnel en modifiant l'activité des enzymes en s'y fixant. Notamment chez *E. coli*, l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme des nucléotides et le métabolisme des lipides est directement inhibée par le (p)ppGpp [pour revue (Kanjee et al., 2012)].

La concentration intracellulaire de (p)ppGpp est contrôlée par deux classes d'enzymes [pour revue (Hauryliuk et al., 2015)]. Des enzymes monofonctionnelles qui possèdent uniquement l'activité (p)ppGpp synthetase, et des enzymes bi-fonctionnelles portant à la fois l'activité de synthèse et de dégradation du (p)ppGpp. Le (p)ppGpp est synthétisé à partir d'ATP et de GDP ou de GTP et son hydrolyse produit du pyrophosphate (PPi) et du GDP ou GTP (**Figure 12**). L'activité synthetase est contrôlée par le ratio entre la quantité d'ARNt chargé et non chargé (Haseltine and Block, 1973). Ainsi, lors d'une carence en nutriments où la quantité d'ARNt non chargé augmente, la synthèse du (p)ppGpp est stimulée. La concentration de (p)ppGpp cellulaire peut alors atteindre des niveaux de l'ordre du millimolaire très rapidement (Wendrich et al., 2002).

## **ii. La réponse stringente chez les mycobactéries**



**Figure 13. Contrôle de la réponse stringente par la voie de signalisation Poly-P/MprAB/SigE chez les mycobactéries.** L'expression de Rel chez les mycobactéries est contrôlée par une cascade de signalisation complexe, qui dépend de la quantité de polyphosphate (Poly-P) dans la cellule. Cette cascade fait intervenir le système à deux composants MprAB et le facteur sigma alternatif SigE. Différents stress permettent de stimuler l'expression de Rel et son activité (p)ppGpp synthetase. Chez les mycobactéries l'accumulation de (p)ppGpp permet la survie à long terme lors d'une privation complète de nutriments, en condition hypoxique, et est nécessaire à la persistance au cours de l'infection. Adapté de Boutte & Crosson 2013.

Chez *M.tb*, la synthèse et la dégradation de l'alarmone est réalisée par Rel<sub>mtb</sub>, une enzyme bi-fonctionnelle (Avarbock et al., 2005, 2000). Les domaines (p)ppGpp synthetase et (p)ppGpp hydrolase sont localisés dans la partie N-terminale de l'enzyme. La partie C-terminale est un domaine de régulation, qui en interagissant probablement avec les ARNt, permet de moduler l'activité de synthèse et de dégradation de la protéine (Avarbock et al., 2005; Jain et al., 2006b). La synthèse de (p)ppGpp est induite fortement par la privation complète de nutriments. D'autres conditions, comme la phase stationnaire, la carence en carbone (0,2% glucose) ou l'inhibition de la chaîne respiratoire (par l'azide de sodium) stimulent la production de l'alarmone, mais de manière plus modérée [Figure 13 (Primm et al., 2000)]. La survie à long terme des mutants  $\Delta rel$  de *M.tb* ( $\Delta rel_{mtb}$ ) et de *M.smeg* ( $\Delta rel_{msm}$ ) est considérablement altérée dans un milieu dépourvu de nutriments, mais aussi en condition anaérobie, suggérant que Rel est impliquée dans la dormance des mycobactéries (Dahl et al., 2005; Primm et al., 2000). Cette hypothèse est soutenue par une étude bio-informatique, reposant sur une analyse intégrée de multiples données de transcriptomiques dans des conditions favorisant l'entrée de la bactérie dans un état de non réplication (Murphy and Brown, 2007). Au cours de l'infection de souris et de cochon d'Inde, la croissance initiale du mutant n'est pas ou peu affectée (Dahl et al., 2003; Klinkenberg et al., 2010), en accord avec une étude montrant que Rel<sub>mtb</sub> est dispensable à la croissance dans les macrophages humains (Primm et al., 2000). Cependant, après cette phase de croissance initiale la survie du mutant  $\Delta rel_{mtb}$  décroît sensiblement, contrairement à celle de la souche *Wt* qui se maintient chez les animaux infectés (Dahl et al., 2003; Klinkenberg et al., 2010). Ce défaut de persistance du mutant a également été observé dans un modèle de granulome artificiel (Karakousis et al., 2004). En générant une série de mutations ponctuelles, Weiss et Stallings (2013) ont montré que l'activité (p)ppGpp synthetase était nécessaire pour restaurer la survie du mutant  $\Delta rel_{mtb}$  *in vivo* (Weiss and Stallings, 2013). L'ensemble de ces données suggère donc que Rel<sub>mtb</sub> jouerait un rôle important dans le développement de l'état de latence, en permettant la survie à long terme de la bactérie (Dalebroux et al., 2010). Plus précisément, Rel<sub>mtb</sub> serait impliquée dans l'adaptation initiale pour faciliter la survie à long terme, plutôt que dans le maintien de l'état de non-réplication (Hampshire et al., 2004).

Dahl et collaborateurs ont comparé les profils d'expression génique d'un mutant  $\Delta rel_{mtb}$  et d'une souche *Wt* en condition de privation complète de nutriments (Dahl et al., 2003). Cette analyse a révélé que plus d'un quart du génome de *M.tb* (1049 gènes) est différentiellement régulé entre les deux souches dans ces conditions. Cependant, seuls 159 ont



une expression entièrement dépendante de Rel<sub>mtb</sub> en condition de carence (69 gènes induits et 90 réprimés). Comme attendu, cette étude montre que Rel<sub>mtb</sub> réprime globalement le processus de traduction, en inhibant notamment l'expression de 54 des 58 gènes codant pour des protéines ribosomales. Rel<sub>mtb</sub> contrôle également l'expression de nombreux gènes impliqués ou potentiellement impliqués dans la survie à long terme et la virulence de *M.tb*. Cela inclut des gènes codant pour des facteurs de virulence, pour des antigènes connus ou des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'enveloppe (Dahl et al., 2003). Cependant, cette analyse globale doit être affinée afin de caractériser plus précisément la contribution de la régulation de ces gènes par la RS dans le processus infectieux.

Chez *E.coli*, les effets du (p)ppGpp sur la transcription sont potentialisés par DksA, une protéine de faible poids moléculaire capable de se lier à l'ARN polymérase (ARN pol) [pour revue (Dalebroux et al., 2010)]. Les mycobactéries disposent d'un autre facteur contrôlant la RS via son interaction avec l'ARN pol : la protéine CarD. Contrairement à DksA, CarD est une protéine essentielle à la viabilité des mycobactéries. L'expression hétérologue de *carD* chez *E.coli* permet de compenser les différents phénotypes d'un mutant  $\Delta dksA$ , comme l'auxotrophie à certains acides aminés (Stallings et al., 2009). Malgré cette similarité fonctionnelle, DksA et CarD régulent probablement l'ARN pol par des mécanismes différents. En effet, DksA et CarD ne sont pas homologues et les analyses structurales suggèrent que ces deux facteurs interagissent avec des domaines différents de l'ARN pol (Gulten and Sacchettini, 2013; Haugen et al., 2008; Stallings et al., 2009). A l'instar d'un mutant de *E.coli*  $\Delta dksA$ , chez une souche de *M.smeg* déplétée de CarD, l'expression des ARNr et de plusieurs gènes codant des protéines ribosomales n'est plus réprimée en condition de carence en nutriments, même si le (p)ppGpp s'accumule encore dans cette souche (Paul et al., 2004; Stallings et al., 2009). En condition de carence, la répression de la machinerie traductionnelle par la RS est donc CarD-dépendante. Cependant, deux études ont montré que CarD était vraisemblablement un activateur de l'expression des ARNr (Garner et al., 2014; Srivastava et al., 2013). Srivastava et collaborateurs (2013) suggèrent que ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par un effet global fort sur le métabolisme de la bactérie du fait de la déplétion de CarD. (Srivastava et al., 2013). En effet, CarD joue aussi un rôle important dans la physiologie, puisque sa déplétion augmente la sensibilité de *M.smeg* au stress oxydatif, à la ciprofloxacine (un antibiotique génotoxique) et à la carence en nutriments (Stallings et al., 2009). De manière intéressante, l'expression par *M.tb* d'une protéine CarD dont l'affinité pour l'ARN pol est réduite, provoque une diminution de la persistance de la





bactérie chez la souris (Weiss et al., 2012), un phénotype rappelant celui du mutant  $\Delta rel_{mtb}$  (Dahl et al., 2003; Klinkenberg et al., 2010). L'ensemble de ces données suggère que CarD, via notamment son interaction avec l'ARN pol, est un composant essentiel de la RS, mais des études supplémentaires sont encore nécessaires pour définir précisément son rôle dans la RS.

### **iii. La voie de signalisation Polyphosphate-MprAB-SigE-Rel<sub>mtb</sub>**

L'expression du gène *rel<sub>mtb</sub>* est stimulée par différents stress, comme l'entrée en phase stationnaire, l'hypoxie ou la carence en phosphate (Boutte and Crosson, 2013). L'activation transcriptionnelle de *rel<sub>mtb</sub>* implique une voie de signalisation incluant le polyphosphate (Poly-P), le STS MprAB et le facteur sigma SigE [**Figure 13** (Boutte and Crosson, 2013; Manganelli, 2007)].

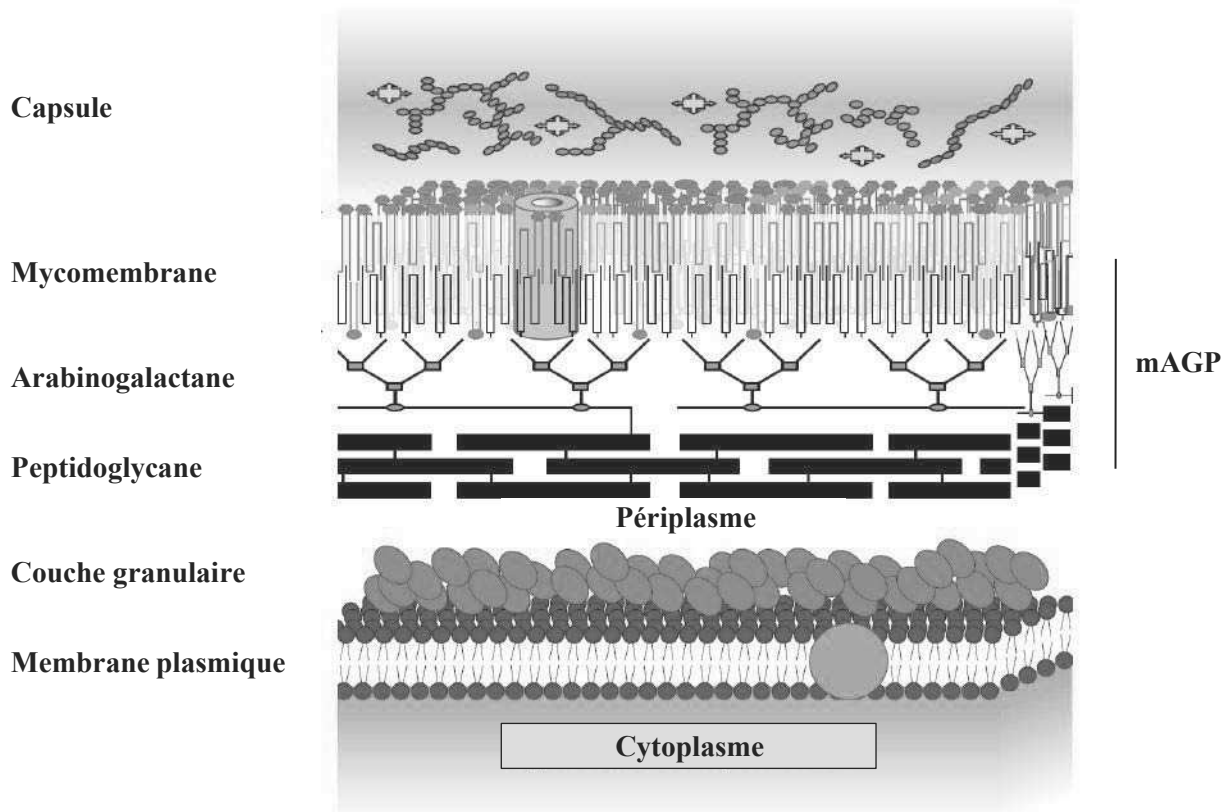
Le poly-P est un polymère linéaire composé de quelques dizaines à plusieurs centaines d'orthophosphates. Ce composé est retrouvé dans toute cellule vivante et est connu principalement pour son rôle dans la physiologie cellulaire [pour revue (Rao et al., 2009)]. Chez les mycobactéries, le poly-P est synthétisé par la polyphosphate kinase Ppk1 (Sureka et al., 2007) et hydrolysé par l'exopolyphosphatase Ppx (Thayil et al., 2011). Le poly-P est un donneur de phosphate pour le senseur histidine kinase MprB, qui pourra, par la suite, transférer ce groupement phosphate à son régulateur de réponse partenaire MprA (Sureka et al., 2007). L'activation du STS MprAB permet d'induire l'expression du facteur sigma alternatif *sigE* (He et al., 2006; Pang et al., 2007), qui, à son tour, va activer l'expression de *rel<sub>mtb</sub>* (Sureka et al., 2007). SigE permet aussi d'entretenir une boucle de rétrocontrôle positif en activant l'expression de l'opéron *mprAB*. Ainsi, chez les mycobactéries le poly-P en activant indirectement l'expression de *rel*, favorise la production de (p)ppGpp [**Figure 13** (Manganelli et al., 2001)]. Cette voie de signalisation est originale, puisqu'ici le Poly-P agit en amont de la synthèse du (p)ppGpp, contrairement à *E.coli* où l'accumulation du Poly-P est favorisée par le (p)ppGpp (Maisonneuve et al., 2013; Manganelli, 2007).

Chez *M.smeg*, en condition de carence en nutriments ou en hypoxie, la capacité de survie d'un mutant  $\Delta ppk1$  est sensiblement altérée (Sureka et al., 2007). Comme, ce phénotype est également observé chez un mutant  $\Delta rel_{msm}$  ou  $\Delta rel_{mtb}$  (Dahl et al., 2005; Primm et al., 2000), il est probable que le défaut de survie de la souche  $\Delta ppk1$  soit, au moins en partie, dû à l'absence d'activation de l'expression de *rel<sub>msm</sub>* à travers la voie du poly-P (Sureka et al., 2007). En accord avec ces données, la délétion de *ppx* se traduit chez *M.tb* par une élévation



de la concentration intracellulaire de Poly-P, corrélée à une augmentation de l'expression de *mprB*, *sigE* et *rel* et à une croissance ralentie de la bactérie (Thayil et al., 2011). De manière intéressante, l'inactivation du gène *mprA* diminue la persistance de *M.tb* chez la souris (Zahrt and Deretic, 2001). Il est donc possible que ce défaut de persistance soit partiellement dû à l'impossibilité d'induire l'expression de *rel<sub>mtb</sub>* dans ce contexte génétique. Cependant, cette hypothèse reste à être démontrée.

Sureka et collaborateurs ont observé un phénomène de bistabilité dans les cultures de *M.smeg* en cours de la croissance, avec la coexistence de deux sous-populations, une exprimant *rel<sub>msm</sub>* faiblement (Low-Rel) et l'autre fortement [High-Rel ; (Sureka et al., 2008)]. La proportion relative des deux sous-populations évolue de manière dynamique en fonction de la phase de croissance. Ainsi, en phase exponentielle de croissance, la majorité des bactéries sont des "Low-Rel". A l'inverse, en phase stationnaire, la majorité des bactéries sont des "High-Rel". La bistabilité est un phénomène qui peut être engendré et maintenu par des schémas de régulation spécifiques dont des boucles d'autorégulation. Celles-ci peuvent être de deux types : positive ou négative (Ferrell, 2002). Ici, la distribution bistable de l'expression de *rel<sub>msm</sub>* est générée par une boucle d'auto-activation de MprA [**Figure 13** (Sureka et al., 2008)]. Chez un mutant *sigE* cette bistabilité est supprimée, montrant le rôle crucial de la voie de signalisation MprAB-SigE dans l'expression bimodale de *rel* chez les mycobactéries (Sureka et al., 2008). Le maintien d'une hétérogénéité est une stratégie de « bet-hedging » participant à la survie d'une espèce ou d'une communauté. Elle permet en effet à une population d'anticiper de futures conditions environnementales défavorables en ayant toujours une sous-population prête à résister à ces stress (Balaban et al., 2013). Par exemple, en phase exponentielle de croissance chez *E.coli*, les rares cellules produisant de forte quantité de (p)ppGpp sont caractérisées par une croissance très ralentie, et une forte tolérance aux antibiotiques (Maisonneuve et al., 2013). Cette hétérogénéité phénotypique chez les mycobactéries pourrait jouer le même rôle et permettre notamment qu'il y ait toujours quelques bactéries qui échappent aux différents stress environnementaux, qu'ils soient artificiels (les drogues) ou naturels (les systèmes de défense de l'hôte) (Ghosh et al., 2011; Sureka et al., 2008).



**Figure 14. Modèle d'organisation de l'enveloppe mycobactérienne.** L'enveloppe mycobactérienne est constituée d'une membrane plasmique sur laquelle est accolée une couche granulaire. La membrane plasmique est séparée du squelette mycolyl-Arabinogalactane-Peptidoglycane (mAGP) par l'espace périplasmique. Le mAGP est composé du peptidoglycane lié de manière covalente à l'arabinogalactane, sur lequel sont estérifiés des acides mycoliques (en noirs) qui constituent probablement le feuillet interne de la mycomembrane. Celle-ci est aussi vraisemblablement composée de différents glycolipides « libres » (en bleu, en orange et en rouge). La mycomembrane est surmontée par une capsule composée majoritairement de polysaccharides et de protéines. Adapté de Marrakchi et al, 2014

### III. L'enveloppe mycobactérienne

#### A. Structure et composition de l'enveloppe mycobactérienne

Dans le règne des bactéries, l'enveloppe mycobactérienne est exceptionnelle de par sa composition et son architecture. Elle est notamment caractérisée par une forte teneur en lipides qui représentent 40% à 60% du poids sec de l'enveloppe, contre seulement 5% chez d'autres bactéries Gram + ou 10% chez les Gram - (Daffé, 2015). La visualisation de cette enveloppe par la technique de microscopie CEMOVIS (cryo-microscopie électronique de sections vitreuses) a permis de proposer un modèle d'organisation (Hoffmann et al., 2008; Marrakchi et al., 2014; Zuber et al., 2008). Comme schématisée sur la **Figure 14**, celle-ci est constituée d'une membrane plasmique enveloppée d'une couche granulaire formée par des protéines insérées ou associées à la membrane plasmique. Cet ensemble est ensuite surmonté par le peptidoglycane (PG), lié à de l'arabinogalactane (AG), sur lequel sont fixés des acides gras à longues chaînes, appelés acides mycoliques (AMs). Un espace périplasmique est retrouvé entre le PG et la membrane plasmique. Bien que les mycobactéries soient classées parmi les Gram +, elles possèdent une membrane externe appelée mycomembrane. Il s'agit d'une bicouche lipidique asymétrique composée d'AMs fixés à l'AG mais également libres, plus d'autres espèces lipidiques. La capsule constitue la dernière couche de l'enveloppe mycobactérienne [pour revue (Daffé, 2015)].

L'enveloppe mycobactérienne constitue une barrière de perméabilité importante qui explique, en grande partie, la haute tolérance intrinsèque de la bactérie à divers antibiotiques. L'enveloppe joue également un rôle fondamental dans la pathogénicité de *M.tb* [voir **Introduction § III, B**]. C'est pourquoi, la caractérisation structurale des différents composants de l'enveloppe et leurs voies de biosynthèses ont fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières années avec pour objectif d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

##### a) La membrane plasmique

La structure et la composition de la membrane plasmique des différentes espèces mycobactériennes, qu'elles soient à croissance lente ou rapide sont similaires à celles d'autres bactéries (Minnikin, 1982). Elle est composée de protéines et de lipides polaires,



majoritairement des phospholipides. On y retrouve notamment le cardiolipide, le phosphatidylglycérol, le phosphatidylinositol et la phosphatidyléthanolamine.

## **b) Le mycolyl-Arabinogalactane-Peptidoglycane (mAGP)**

Le mycolyl-Arabinogalactane-Peptidoglycane (mAGP) forme la structure "cœur" de l'enveloppe mycobactérienne. Il est composé de trois macromolécules reliées entre elles : le PG est relié à l'AG de manière covalente, qui est lui-même estérifié avec les AMs.

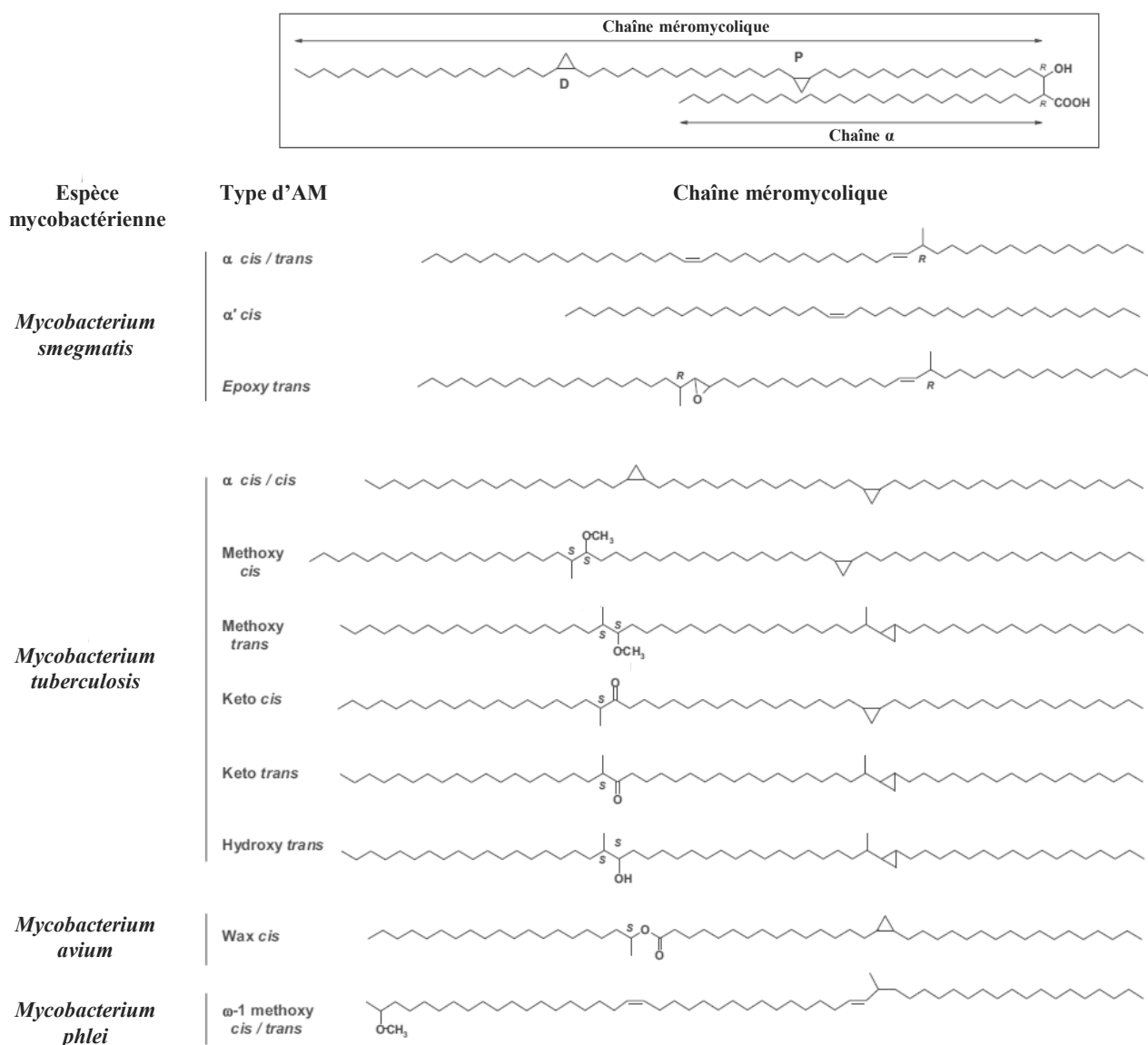
### ***i.* Le peptidoglycane**

Le squelette de peptidoglycane est un polysaccharide constitué d'unités alternées de N-acétyl-glucosamine et d'acide muramique modifié (liés en  $\beta 1 \rightarrow 4$ ). Chez les mycobactéries, les acides muramiques peuvent être N-glycolylés ou N-acétylés (Mahapatra et al., 2005). Deux polymères glycaniques sont reliés entre eux par des ponts peptidiques fixés au groupement carboxyle des acides muramiques. Chez *M.tb*, le pont peptidique est un tétrapeptide de type L-alanyl—D-isoglutaminyl—méso-diaminopimétyl—D-alanine [pour revue (Crick et al., 2001)]. Ces ponts permettent de constituer un réseau dont la rigidité assure le maintien de la forme de la bactérie. L'arabinogalactane est relié au peptidoglycane par une liaison phosphodiester avec 10 à 12% des acides muramiques, via un phosphodisaccharide "linker" constitué d'un rhamnose et d'une molécule de N-acétyl-glucosamine (Lederer et al., 1975; McNeil et al., 1990).

### ***ii.* L'arabinogalactane**

L'arabinogalactane est un polysaccharide ramifié complexe composé d'un domaine galactane sur lequel est connecté trois chaînes d'arabinane (Bhamidi et al., 2008). Le domaine galactane est constitué de trente-deux résidus D-galactofuranosyle (D-Galf), alors que chaque domaine arabinane se compose de trente et un résidus de D-arabinofuranosyle (D-Araf). Les chaînes d'arabinane sont attachées au domaine galactane au niveau des résidus 8, 10 et 12 de D-Galf (Alderwick et al., 2005). Enfin, selon l'espèce mycobactérienne, une à deux chaînes d'arabinane sont totalement estérifiées par des AMs au niveau des résidus D-Araf pénultièmes et terminaux. La chaîne d'arabinose non estérifiée par un AM est succinylée (Bhamidi et al., 2008; McNeil et al., 1991).





**Figure 15. Structure et diversité des acides mycoliques chez les mycobactéries.** Dans l'encadré : représentation de la structure d'un acide mycolique (AM) de type  $\alpha$ -mycolate. P et D indiquent respectivement les positions proximale et distale sur la chaîne méromycolique où sont introduits les groupements fonctionnels. Les structures des chaînes méromycoliques des différents types d'AMs retrouvés chez plusieurs espèces mycobactériennes sont représentées en dessous. D'après Marrakchi et al, 2014.

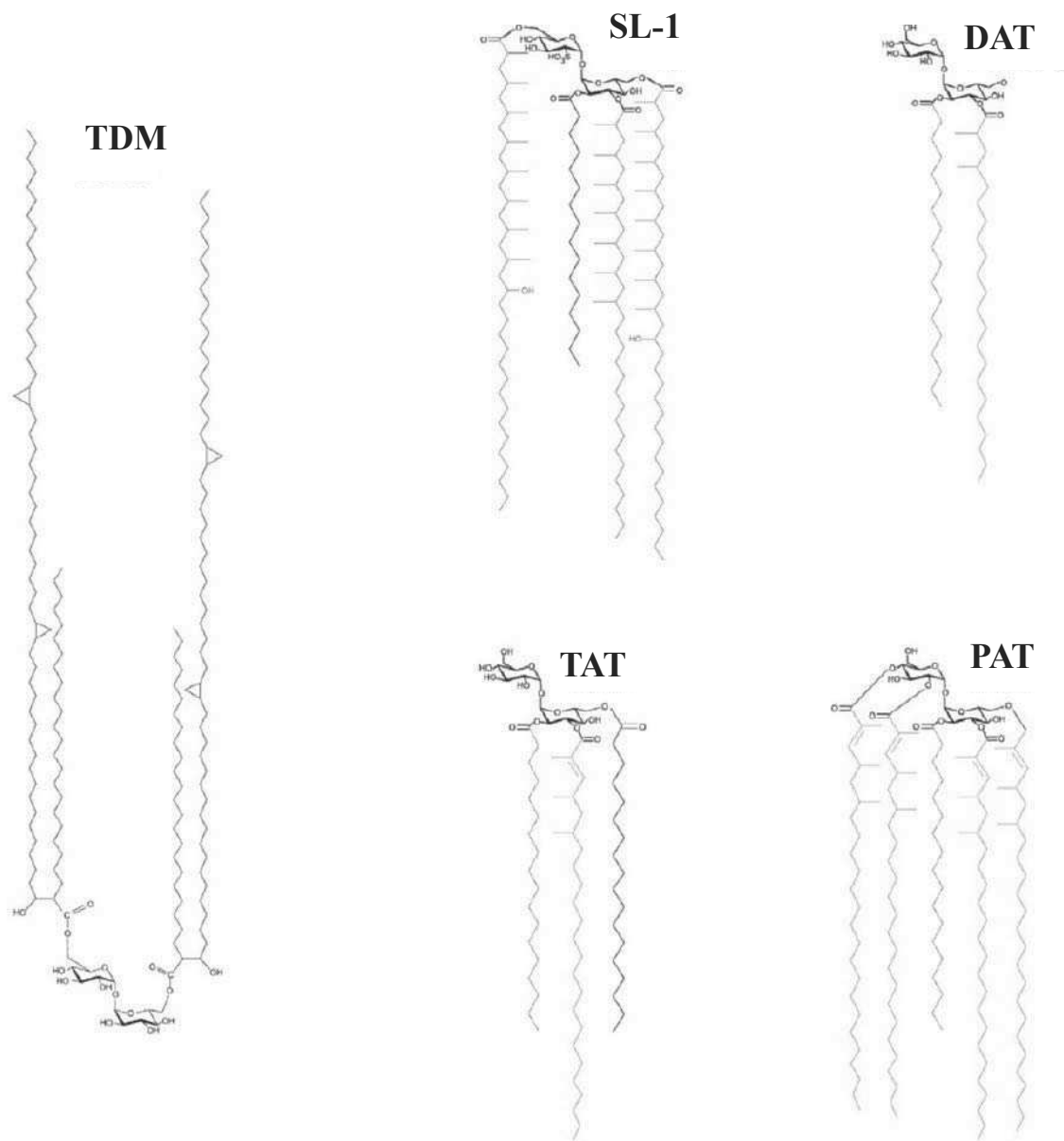
### iii. Les acides mycoliques

Les AMs sont des acides gras  $\alpha$ -ramifiés et  $\beta$ -hydroxylés que l'on retrouve chez toutes les espèces appartenant au sous-ordre des *Corynebacterineae* avec quelques rares exceptions [*i.e.* *Corynebacterium kroppenstedtii* et *Corynebacterium amycolatum* (Collins et al., 1988, 1998)]. Dans ce groupe, la taille des AMs varie d'une espèce à une autre. Par exemple, la longueur des AMs de *Corynebacterium glutamicum* varie de C<sub>22</sub> à C<sub>36</sub>, alors que celle des AMs de *M.tb* de C<sub>60</sub> à C<sub>90</sub> [pour revue (Marrakchi et al., 2014)]. Les AMs sont les lipides les plus abondants de l'enveloppe mycobactérienne, et sont pour la majorité d'entre eux (90 à 95%) liés au squelette d'AG. Les AMs liés forment le feuillet interne de la mycomembrane.

Chez les mycobactéries, les AMs résultent de la condensation entre une chaîne courte appelée "chaîne  $\alpha$ " (C<sub>22</sub>-C<sub>26</sub>), et une chaîne longue appelée "chaîne méromycolique" (C<sub>48</sub>-C<sub>64</sub>) [Figure 15 ; (Asselineau and Lederer, 1950)]. La chaîne méromycolique est décorée avec des groupements fonctionnels qui sont localisés en position dite distale et proximale. Cette position est définie en fonction de l'éloignement de la décoration par rapport à la fonction carboxylique de l'AM. Ces groupements fonctionnels peuvent être de différentes natures permettant de distinguer plusieurs classes d'AMs, dont le profil global est spécifique d'une espèce de mycobactérie donnée (Figure 15). Les AMs les plus abondants de l'enveloppe de *M.tb* sont les  $\alpha$ -mycolates [jusqu'à 50% ; (Watanabe et al., 2002)]. Les  $\alpha$ -mycolates sont caractérisés par une fonction cyclopropane en position proximale et distale de conformation *cis*. Les autres espèces d'AMs retrouvées chez *M.tb* sont : les méthoxy- (*cis* et *trans*), les céto- (*cis* et *trans*) et les hydroxy-mycolates (*cis*). Ces trois types d'AMs se distinguent des  $\alpha$ -mycolates par la présence d'une fonction oxygénée en position distale sur leur chaîne méromycolique. Il s'agit d'une fonction méthoxyle, cétone ou hydroxyle (Figure 15) [pour revue (Marrakchi et al., 2014)].

### c) Les autres lipides

L'enveloppe mycobactérienne est composée d'une autre catégorie de lipides dits "extractibles". Ceux-ci sont, vraisemblablement pour la majorité d'entre eux, localisés dans le feuillet externe de la mycomembrane. Contrairement aux AMs estérifiés sur le squelette d'AG, ces lipides ne sont associés à l'enveloppe qu'au travers d'interactions hydrophobes. Ces lipides "libres" sont dits "extractibles" parce qu'ils ont la propriété de pouvoir être extraits par des solvants organiques. D'une espèce mycobactérienne à une autre, la composition globale de



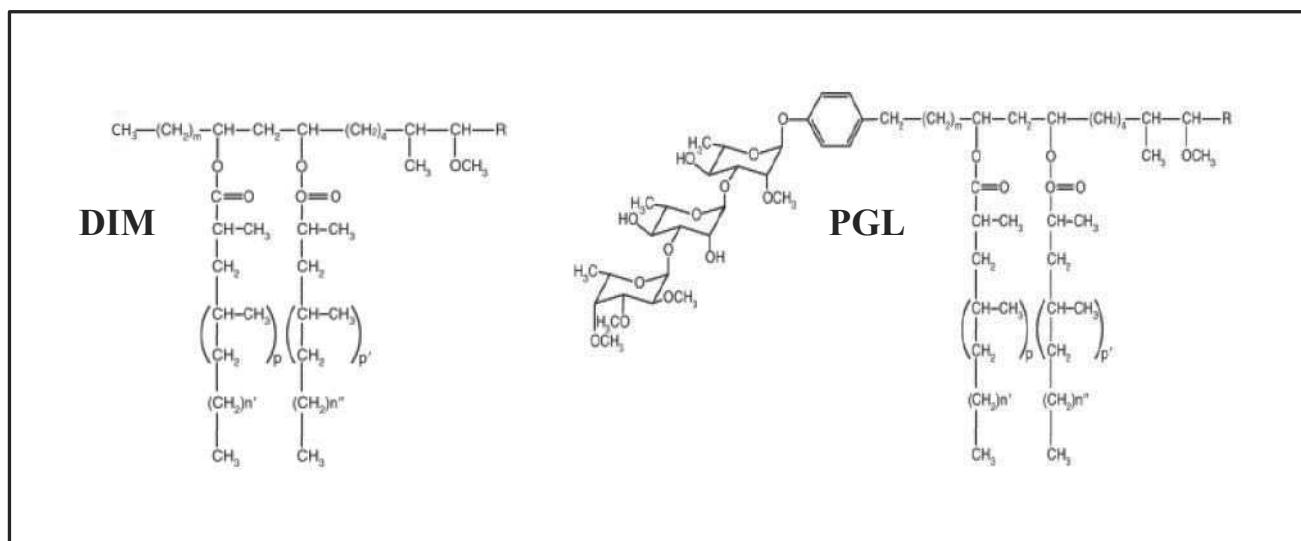
**Figure 16. Les lipides à tréhalose.** TDM : dimycolate de tréhalose ; SL-1 : sulfolipide-1; DAT : di-acyltrehalose; TAT : tri-acyltrehaloses; PAT : poly- ou penta-acyltrehalose. D'après Minnikin et al, 2002

l'enveloppe en lipides extractibles peut être très variable. Chez *M.tb*, on retrouve plusieurs types de ces lipides que l'on peut classer en plusieurs catégories : les lipides à tréhalose, les dérivés de mycosérosates, et les dérivés glycosylés du phosphatidylinositol (PI).

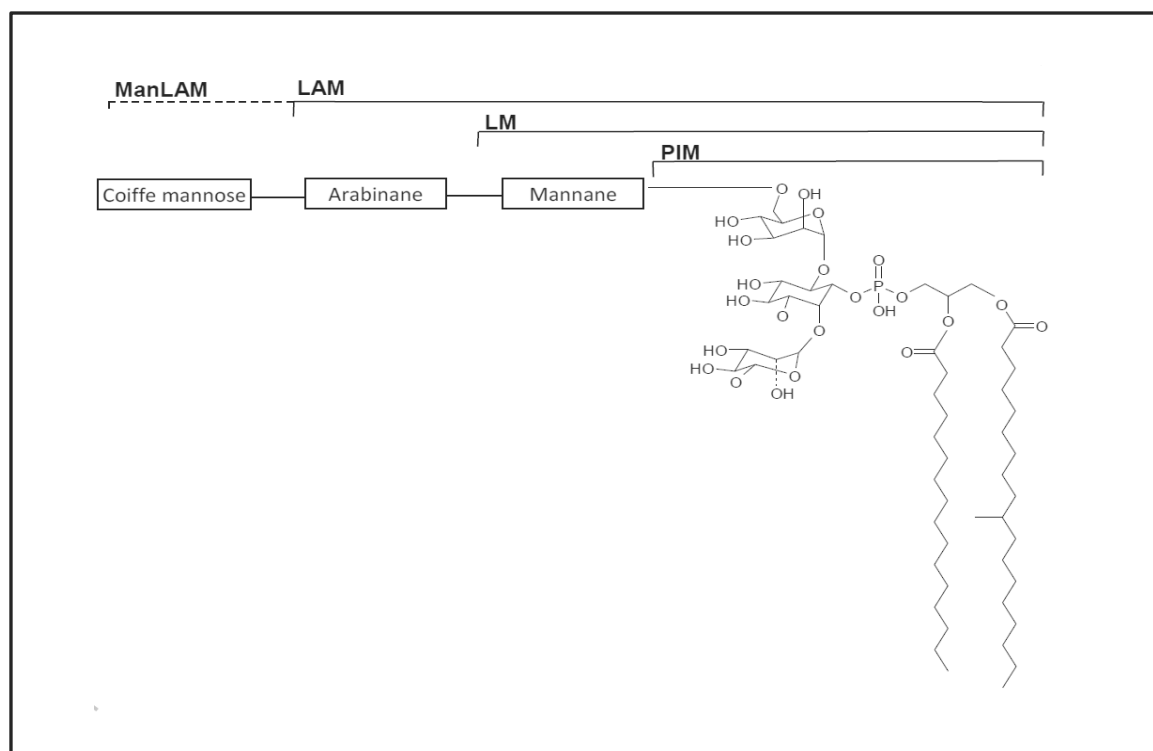
❖ Les lipides à tréhalose: Cette catégorie regroupe les différents lipides composés d'un tréhalose sur lequel est estérifié un ou plusieurs acides gras [pour revue (Minnikin et al., 2002; Neyrolles and Guilhot, 2011)]. Parmi ceux-ci, il y a le monomycolate de tréhalose (TMM) et le dimycolate de tréhalose (TDM). Ces glycolipides à tréhalose sont constitués respectivement d'un ou deux AMs, dont la structure est identique à celle des AMs estérifiés sur l'AG (**Figure 16**). Le TDM est le lipide responsable de la croissance filamenteuse des mycobactéries en forme de "corde", c'est pourquoi le TDM est aussi appelé "cord factor". Le TMM et le TDM sont ubiquitaires chez les mycobactéries. D'autres glycolipides à tréhalose comme les sulfatides (SLs), les di-acyltréhaloses (DATs), les tri-acyltréhaloses (TATs) et les poly- ou penta-acyltréhaloses (PATs) ne sont retrouvés que chez *M.tb* et quelques autres mycobactéries pathogènes. Les SLs sont constitués d'un tréhalose sulfaté qui est acylé par 2 à 4 acides gras poly-méthylés. Chez *M.tb*, le SL le plus abondant dans l'enveloppe est un SL tétra-acylé appelé sulfolipide-1 (SL-1) (**Figure 16**). Les DATs, TATs et PATs sont des glycolipides composés d'un tréhalose acylé par un acide gras à chaîne linéaire et un ou plusieurs acides gras di- ou tri-méthylés (**Figure 16**). Une étude récente suggère que les DATs sont les précurseurs nécessaires pour la biosynthèse des TATs et des PATs (Touchette et al., 2015).

❖ Les dérivés de mycosérosates: Ce groupe de lipides comprend les dimycosérosates de phtiocérol (DIMs) et les phénolglycolipides (PGLs). Ceux-ci sont composés d'une longue chaîne de phtiocérol sur laquelle sont estérifiés deux acides gras poly-méthylés appelés acides mycosérosiques (**Figure 17**). Pour les PGLs, à cette structure est associé un noyau phénolique sur lequel est fixé un tri-saccharide (**Figure 17**). La structure du domaine saccharidique des PGLs varie selon l'espèce mycobactérienne (Daffé and Laneelle, 1988). Les DIMs et les PGLs sont synthétisés par *M.tb* mais aussi d'autres espèces pathogènes majeures comme *Mycobacterium leprae* et *Mycobacterium ulcerans*.

❖ Les dérivés glycosylés du phosphatidylinositol (PI) : Le PI est un des phospholipides les plus abondants chez les mycobactéries (Jackson et al., 2000), et entre dans la composition de plusieurs autres lipides de l'enveloppe dont les phosphatidyl inositol mannosides (PIMs) constitués d'un PI glycosylé sur l'inositol par 1 à 6 mannoses (**Figure 18**). L'ajout d'un domaine mananne sur les PIMs permet de former le lipomannane (LM) (**Figure 18**). Le LM



**Figure 17. Les lipides dérivés de mycosérosates.** DIM : dimycosérosates de phitiocérol; PGL : phénolglycolipide ;  $m = 20-22$ ;  $n', n'' = 16, 18$ ;  $p, p' = 2-5$ ;  $R = -CH_2-CH_3$  or  $-CH_3$ . D'après Sulzenbacher et al, 2006



**Figure 18. Les lipides dérivés du phosphatidylinositol.** PIM : phosphatidyl inositol mannosides; LM : lipomannane; LAM : lipoarabinomannane; ManLAM : lipoarabinomannane mannosylé. D'après Passemar, 2013

peut lui-même être coiffé par un domaine arabinane pour donner du lipoarabinomannane (LAM) (**Figure 18**). Chez les espèces pathogènes, le LAM est modifié par l'ajout sur son extrémité non réductrice d'une coiffe dite à mannose pour former du lipoarabinomannane mannosylé (ManLAM) (**Figure 18**) [pour revue (Goude and Parish, 2008)].

#### **d) La capsule**

La capsule représente la dernière couche de l'enveloppe mycobactérienne. Chez les mycobactéries à croissance lente comme *M.tb*, le constituant majoritaire de la capsule est un glucane composé de cinq à six unités saccharidiques (Lemassu and Daffé, 1994). La capsule contient également un hétéropolysaccharide: le D-arabino-D-mannane. Chez *M.tb*, cet arabinomannane possède une structure identique à celle de la partie saccharidique du ManLAM (Ortalo-Magné et al., 1996a). Ce polysaccharide serait issu de l'hydrolyse enzymatique du ManLAM. La capsule est aussi composée de nombreuses protéines sécrétées par la bactérie (Raynaud et al., 1998; Sani et al., 2010), dont les mycoloytransférases Ag85ABC [voir **Introduction § IV, E**]. La capsule de *M.tb* contient également de petites quantités de lipides (2 à 3% du matériel capsulaire), dont notamment des PGLs et des DIMs à sa surface (Ortalo-Magné et al., 1996b).

### **B. Rôles de l'enveloppe**

#### **a) L'enveloppe est une barrière physique très imperméable**

L'enveloppe mycobactérienne, de par son architecture et sa composition, est une barrière protectrice extrêmement efficace qui joue un rôle essentiel dans la physiologie des mycobactéries (Daffé, 2015). Cette enveloppe confère, notamment aux mycobactéries, la propriété d'être résistante à l'alcool et aux acides forts [voir **Introduction § II, A**]. L'enveloppe est également une barrière physique très imperméable qui limite la pénétration de différents composés. Cette forte imperméabilité est considérée comme une des principales causes de la haute tolérance intrinsèque des mycobactéries à plusieurs antibiotiques (Nguyen and Pieters, 2009), écartant de ce fait ces antibiotiques comme traitement thérapeutique contre la tuberculose.

La forte teneur en lipides de l'enveloppe, en particulier les AMs qui est l'espèce lipidique la plus abondante, confère aux mycobactéries une hydrophobicité de surface très importante. Cette hydrophobicité constitue une barrière de perméabilité aux composés



hydrophiles [*e.g.* glucose, glycérol (Jarlier and Nikaido, 1990; Nguyen and Pieters, 2009)], qui peut être jusqu'à 100 fois plus importante que celle d'autres espèces bactériennes (Jarlier and Nikaido, 1990). A l'instar des molécules hydrophiles, la perméabilité aux molécules hydrophobes (*e.g.* chenodeoxycholate, rouge de Nile) est également plus faible chez les mycobactéries. L'efficacité de pénétration de ce type de composés est directement corrélée à la fluidité membranaire. Ainsi, lorsque la fluidité membranaire augmente, l'efficacité de pénétration des molécules hydrophobes augmente également. De manière intéressante, la fluidité de l'enveloppe mycobactérienne est faible, ce qui permet d'expliquer la diffusion plus lente des composés hydrophobes (Jarlier and Nikaido, 1994). Les AMs sont les acteurs principaux influençant la fluidité de l'enveloppe mycobactérienne (Liu et al., 1996). Par conséquent, l'altération de la structure des AMs ou de leur profil global peut conduire à la diminution de l'imperméabilité des mycobactéries à différents composés (hydrophobes et hydrophiles), avec pour corollaire une augmentation de la sensibilité à plusieurs antibiotiques (Dubnau et al., 2000; Gao et al., 2003; Yuan et al., 1998).

## **b) Implication des lipides de l'enveloppe dans la pathogénicité**

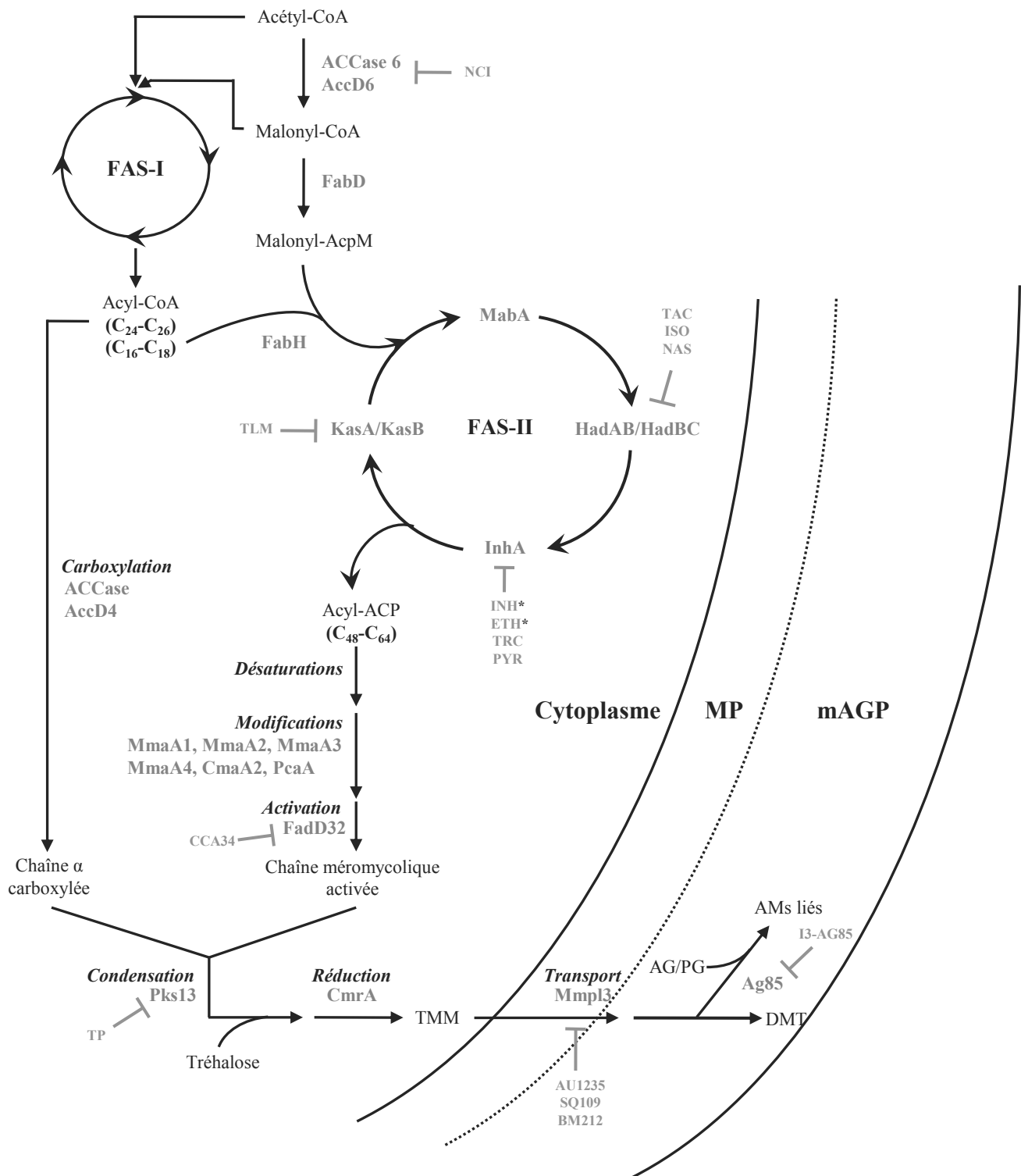
La contribution des différents lipides de l'enveloppe à la pathogénicité de *M.tb* a pu être évaluée notamment grâce à l'analyse de la virulence de souches mutées totalement ou partiellement déficiente pour la biosynthèse de certains lipides. Ainsi, certains lipides sont capables de moduler la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires ou, le processus de phagocytose, et/ou sont impliqués dans le trafic vésiculaire intra-macrophagique [pour revue (Neyrolles and Guilhot, 2011)]. Par exemple, nous avons vu précédemment que le ManLAM, en s'intercalant dans la membrane du phagosome, participait à l'inhibition de la fusion phagolysosomale [voir Introduction § II, C, a), ii].

Parmi tous les lipides de l'enveloppe, le TDM et les AMs, espèces lipidiques les plus abondantes chez *M.tb*, sont considérés comme particulièrement importants pour la pathogénicité de la bactérie. Le TDM ou "cord factor" a d'ailleurs été un des premiers facteurs de virulence identifié chez *M.tb* (Bloch, 1950; Noll et al., 1956). Ce glycolipide est nécessaire à la survie de *M.tb* à l'intérieur des macrophages (Indrigo et al., 2002, 2003; Katti et al., 2008). Le rôle crucial des AMs pour la pathogénicité a été mis en évidence avec plusieurs mutants de gènes de biosynthèse. Ainsi, des altérations de la structure des AMs, mêmes minimales, sont généralement associées à une forte diminution de la virulence de *M.tb* (Bhatt et al., 2007a; Dubnau et al., 2000; Rao et al., 2006; Vilchèze et al., 2014).





Les AMs oxygénés, en particulier les céto-mycolates, sont essentiels à la différenciation des macrophages infectés en macrophages spumeux (MS) (Dkhar et al., 2014; Peyron et al., 2008). Les MS se distinguent par leur incapacité à phagocyter à nouveau, par une diminution de leurs activités bactéricides, et par l'accumulation de corps lipidiques dans leur cytosol qui seraient potentiellement une source nutritive pour *M.tb* au cours de l'infection. De même, plusieurs jours post-infection, le nombre de bacilles dans les MS reste stationnaire, alors qu'il continue d'augmenter à l'intérieur des autres macrophages. Ces observations suggèrent que *M.tb* est à l'état dormant dans les MS, impliquant de ce fait que les MS seraient un réservoir de bacilles vivants mais persistants. La différenciation des macrophages en MS intervient lors de la formation de granulome, or le TDM et les céto-mycolates sont en mesure, à eux-seuls, d'induire respectivement la formation de granulomes et de MS *in vitro* (Dkhar et al., 2014; Lang, 2013). Il est donc envisageable que ces lipides puissent permettre à *M.tb* de transformer le macrophage en un environnement propice à la survie à long terme du bacille. Cependant, il n'y a pas de données permettant de confirmer cette théorie à l'heure actuelle (Lang, 2013; Marrakchi et al., 2014).



**Figure 19. Biosynthèse et inhibition de la biosynthèse des acides mycoliques.** Chez les mycobactéries, la biosynthèse des AMs est réalisée par l'action combinée des systèmes enzymatiques FAS-I et FAS-II. FAS-I permet la synthèse *de novo* de 2 types d'acides gras à courtes chaînes : la chaîne α de taille C<sub>24</sub>-C<sub>26</sub>, et un acyl-CoA de taille C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub>. FAS-II assure la synthèse de la chaîne méromycolique en utilisant comme précurseur l'acyl-CoA de taille C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> issu de FAS-I. La chaîne méromycolique est modifiée, puis condensée avec une chaîne α; ce qui, après réduction, produit les AMs matures. MP : membrane plasmique; mAGP : mycolyl-Arabinogalactane-Peptidoglycane. Les inhibiteurs connus et les étapes inhibées dans la voie de biosynthèse des AMs sont indiqués en rouge. Les composés indiqués avec une astérisque (\*) sont les antibiotiques déjà utilisés pour le traitement de la tuberculose. NCI : NCI-172033; TLM : thyolactomycine; PYR : pyridomycine; TAC : thiacétazone; ISO : isoxyl; NAS : NAS-21/NAS-94; INH : isoniazide; ETH : éthionamide; TRC : triclosan; TP : thiophène. Adapté de Marrakchi et al, 2014.

## IV. Les acides mycoliques : biosynthèse et régulation

Les AMs sont des éléments fondamentaux dans l'architecture de l'enveloppe mycobactérienne. En contribuant à la forte imperméabilité de l'enveloppe, ils sont impliqués dans la haute tolérance intrinsèque de *M.tb* aux antibiotiques. Les AMs, liés à l'AG ou associés au tréhalose pour former le TDM, sont également importants à la virulence de la bactérie. Enfin, les AMs sont des lipides essentiels à la viabilité des mycobactéries. L'ensemble de ces caractéristiques fait de la biosynthèse des AMs une cible thérapeutique privilégiée contre laquelle certains antibiotiques sont déjà utilisés (Marrakchi et al., 2014; de Souza et al., 2008). Cette ambition thérapeutique, qui a été le moteur de nombreuses études, a permis d'apporter des connaissances assez fines sur la voie de biosynthèse des AMs.

### A. Vue d'ensemble de la biosynthèse

La biosynthèse des AMs résulte de l'action combinée de deux systèmes enzymatiques (**Figure 19**). Le premier est le système Fatty Acid Synthetase de type I (FAS-I), de type eucaryote, qui est une enzyme multi-domaine assurant la synthèse des acides gras *de novo* à chaîne courte ( $C_{16-18}$  et  $C_{24-26}$ ). Le second est le système FAS-II multi-protéiques, de type procaryote, qui assure la synthèse d'un acide gras à longue chaîne ( $C_{48-64}$ ) : la chaîne méromycolique. Il utilise comme substrat un acyl-CoA d'au moins 16 atomes de carbone, produit de l'activité de FAS-I. La chaîne méromycolique ( $C_{48-64}$ ), issue de FAS-II, sera ensuite décorée avec des groupements fonctionnels (pour *M.tb* : cyclopropane, méthoxyle, cétone, méthyle, et hydroxyle) par des méthyltransférases. La chaîne méromycolique activée sera ensuite condensée avec une chaîne  $\alpha$  ( $C_{24-26}$ ) préalablement carboxylée issue de FAS-I, et une dernière étape de réduction donnera les AMs matures. Les AMs sont transportés à travers la membrane plasmique probablement sous forme de TMM (ajout d'un tréhalose), puis sont affrétés sur l'AG ou transformés en TDM [**Figure 19** (Marrakchi et al., 2014)].

Deux antibiotiques ciblant l'enzyme InhA, appartenant au système FAS-II, sont actuellement utilisés dans le traitement de la tuberculose : l'isoniazide (INH, antibiotique de 1<sup>ère</sup> ligne) et l'éthionamide (ETH, antibiotique de 2<sup>nd</sup> ligne) (Banerjee et al., 1994; Morlock et al., 2003; Wang et al., 2007). Ces dernières années ont permis d'identifier plus d'une dizaine de nouveaux composés ciblant des enzymes de biosynthèse des AMs [**Figure 19** (Marrakchi et al., 2014)]. Cependant, à ce jour, un seul de ces antibiotiques est en essai clinique : le SQ-



109 (**Figure 6**). Ce composé empêche la translocation du TMM à travers la membrane plasmique, ce qui suggère que le SQ-109 cible le transporteur Mmp13 [**Figure 19** (Tahlan et al., 2012)].

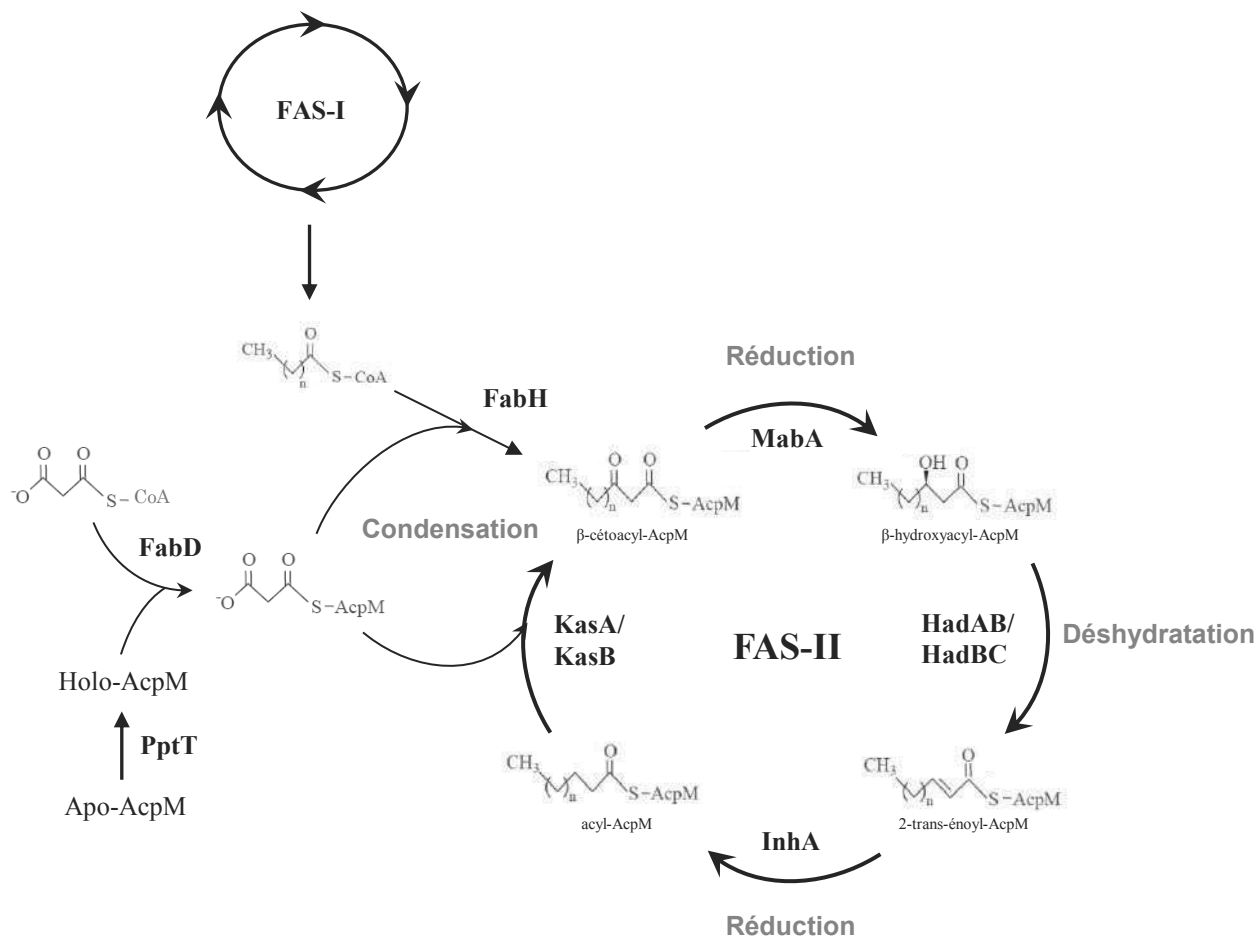
## **B. FAS-I : synthèse de la chaîne $\alpha$ et du précurseur de FAS-II**

Le système FAS-I est une enzyme unique codée par le gène *fas*, essentiel chez les mycobactéries (Zimhony et al., 2004). FAS-I possède 7 domaines distincts lui permettant de catalyser la synthèse *de novo* d'acides gras à partir de l'acétyl-CoA (Bloch and Vance, 1977; Fernandes and Kolattukudy, 1996). Le malonyl-CoA est l'unité d'élongation incorporé à chaque cycle catalytique. Il provient de la carboxylation de l'acétyl-CoA par le complexe enzymatique ACCase 6 (Acyl-CoA carboxylase 6), constitué de la sous unité carboxyltransferase AccD6 et de la sous unité AccA3 (Daniel et al., 2007; Kurth et al., 2009).

Le gène *accA3* est prédit comme étant essentiel à la viabilité de *M.tb* (Griffin et al., 2011; Sassetti et al., 2003; Zhang et al., 2012). De manière intéressante, la surexpression de *accA3* diminue la perméabilité de l'enveloppe de *M.smeg* à un composé hydrophobe (le rouge de Nile) avec pour conséquence une augmentation de la résistance de la bactérie à certains antibiotiques lipophiles (Xu et al., 2014). L'autre sous unité de l'ACCase 6, la protéine AccD6, a été démontrée comme essentielle pour la viabilité de *M.tb* (Pawelczyk et al., 2011). La diminution de l'expression d'*accD6* chez un mutant conditionnel a pour conséquence l'inhibition de la biosynthèse des AMs et des lipides extractibles, associée à l'altération de la surface de l'enveloppe visible par microscopie électronique (Pawelczyk et al., 2011). L'ensemble de ces données indiquent donc que le complexe ACCase 6 (AccD6 + AccA3) est impliqué dans le maintien de la structure et des propriétés de surfaces de l'enveloppe.

Les acides gras produits par FAS-I sont des acyl-CoA dont la distribution est bimodale, de taille C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> et C<sub>24</sub>-C<sub>26</sub>. Les acyl-CoA en C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> seront ensuite pris en charge et allongés par le système FAS-II, pour former la chaîne méromycolique. Les produits en C<sub>24</sub>-C<sub>26</sub> formeront la chaîne  $\alpha$  des AMs. Les acyl-CoA, produits par FAS-I, sont également utilisés pour la synthèse d'autres lipides présents dans l'enveloppe, comme par exemple les DIMs, les SLs ou les phospholipides [pour revue (Mukhopadhyay et al., 2012)].

## **C. FAS-II : Synthèse de la chaîne méromycolique**



**Figure 20. Biosynthèse de la chaîne méromycolique par le système FAS-II.** Un cycle d'élongation FAS-II est constitué de quatre réactions enzymatiques successives : une **condensation**, une **réduction**, une **déshydratation** puis de nouveau une **réduction**. La toute 1<sup>ère</sup> condensation, réalisée par l'enzyme FabH, assure la connexion entre les systèmes FAS-I et FAS-II. Les condensations suivantes sont réalisées par les enzymes KasA et KasB. Adapté de Schaeffer et al, 2001; et de Sacco et al, 2007b

Contrairement au système FAS-II d'autres bactéries, le système FAS-II mycobactérien est incapable de réaliser la synthèse *de novo* d'acides gras à partir de l'acétyl-CoA (Odriozola et al., 1977). Composé de plusieurs enzymes à priori mono-fonctionnelles, FAS-II permet aux mycobactéries d'allonger le substrat issu de FAS-I par des cycles itératifs jusqu'à obtenir la chaîne méromycolique pleine taille. L'activité des enzymes de FAS-II est dépendante *in vitro* et vraisemblablement *in vivo* d'une ACP (Acyl Carrier Protein, appelée AcpM chez *M.tb*), qui assure le transport du substrat en cours d'élongation entre les enzymes de FAS-II.

### a) Initiation

La synthèse de la chaîne méromycolique par FAS-II nécessite une phase d'initiation composée de trois étapes : **(i)** l'activation de l'AcpM ; **(ii)** la synthèse de l'unité d'élongation, le malonyl-AcpM ; et **(iii)** la condensation de l'acyl-CoA en C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> issu de FAS-I avec un malonyl-AcpM (**Figure 20**).

**(i)** AcpM est une protéine qui nécessite d'être activée par une modification post-traductionnelle (ligation d'un 4'phosphopantéthéine) (Kremer et al., 2001). AcpS a été depuis longtemps considérée comme étant l'enzyme permettant de catalyser le passage de la forme inactive de l'AcpM dite "apo-AcpM" à la forme active dite "Holo-AcpM" (Chalut et al., 2006). Cependant, une étude très récente a proposé que le transfert d'un groupement 4'-phosphopantéthéine (ou bras P-pant) sur la forme apo-AcpM soit réalisé par l'enzyme PptT, et non AcpS (Zimhony et al., 2015) (**Figure 20**).

**(ii)** L'unité d'élongation du système FAS-II, le malonyl-AcpM, est le produit d'une réaction de transacylation entre l'holo-AcpM et le groupement malonate d'un malonyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme FabD, une malonyl CoA:ACP transacylase (Kremer et al., 2001) (**Figure 20**).

**(iii)** Le malonyl-AcpM est condensé avec l'acyl-CoA issu de FAS-I. Des expériences *in vitro* suggèrent que cette condensation est réalisée par FabH, une  $\beta$ -cétolACP synthase III qui possède une affinité plus forte pour les acyl-CoA que les acyl-ACP (Choi et al., 2000). Le produit de condensation (un  $\beta$ -cétolACP) est ensuite pris en charge par le système FAS-II (**Figure 20**).





Les protéines AcpM, FabD et FabH sont considérées comme essentielles à la biosynthèse des AMs. Cependant, l'essentialité de ces gènes pour la viabilité de *M.tb* n'a encore jamais été démontrée. D'après des expériences de mutagenèse à haute densité par insertion de transposon, les gènes *acpM* et *fabD* sont prédits comme essentiels, mais étonnement, *fabH* est prédit comme non essentiel (Griffin et al., 2011; Sassetti et al., 2003; Zhang et al., 2012). En accord avec ces données, des orthologues à *acpM* et *fabD* sont retrouvés chez *M.leprae* (considéré comme le génome minimal mycobactérien), mais aucun orthologue de *fabH*. Si le gène *fabH* est démontré comme étant réellement non essentiel expérimentalement, il serait important d'évaluer précisément sa contribution dans la biosynthèse des AMs, en analysant notamment le profil des AMs d'une souche de *M.tb* délétée de *fabH*. Enfin, si *fabH* n'est pas essentiel, cela implique que *M.tb* possède au moins un autre gène codant pour une enzyme ayant une activité FabH redondante qu'il serait intéressant d'identifier.

## b) Elongation

Un cycle d'élongation par FAS-II implique quatre réactions enzymatiques successives : une **condensation**, une **réduction**, une **déshydratation** et une seconde **réduction** (**Figure 20**). Le 1<sup>er</sup> cycle d'élongation débute par la condensation entre l'acyl-CoA provenant de FAS-I et un malonyl-AcpM réalisée par FabH pour produire un  $\beta$ -cétoacyl-AcpM. Celui-ci est alors réduit en un  $\beta$ -hydroxyacyl-AcpM par la réductase MabA, pour être ensuite déshydraté par les hétérodimères HadAB et HadBC formant un 2-trans-énoyl-AcpM. La dernière étape du cycle est catalysée par la réductase InhA, pour former un acyl-AcpM. Lors des cycles d'élongation suivants, les condensations sont réalisées par les condensases KasA et KasB (**Figure 20**). Les cycles d'élongation s'arrêtent lorsque l'acyl-AcpM, produit par FAS-II, atteint la taille d'une chaîne méromycolique ( $C_{48-64}$ ), ce qui implique une vingtaine de cycles d'élongation.

### i. Les réductases MabA et InhA

Les deux étapes de réduction du cycle FAS-II sont réalisées par respectivement MabA et InhA. Ces deux réductases possèdent des structures tertiaires comparables en accord avec leur utilisation de substrats très similaires (Cohen-Gonsaud et al., 2002; Rozwarski et al., 1999). Les gènes correspondants, *mabA* et *inhA*, forment un opéron chez *M.tb* et *M.bovis* BCG mais sont transcrits indépendamment chez *M.smeg* (Banerjee et al., 1998).



MabA, aussi appelée FabG1, catalyse la 1<sup>ère</sup> étape de réduction du cycle FAS-II (**Figure 20**). *In vitro*, MabA métabolise préférentiellement les substrats de grand taille (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>), en accord avec le fait qu'*in vivo* chez les mycobactéries, FAS-II n'utilise que les substrats issus de FAS-I (> C<sub>16</sub>) (Cohen-Gonsaud et al., 2002; Marrakchi et al., 2002). Le gène *mabA* a été montré comme étant essentiel pour la viabilité de *M.tb* (Parish et al., 2007).

InhA, catalyse la seconde réduction du cycle FAS-II (**Figure 20**). A l'instar de MabA, *in vitro*, InhA réduit préférentiellement les substrats à chaînes longues (C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub>) mais possède également une affinité beaucoup plus forte pour les résidus dérivés de l'ACP plutôt que ceux dérivés du CoA (Quémard et al., 1995). InhA est également essentielle à la viabilité des mycobactéries (Bhatt et al., 2005; Vilchèze et al., 2000). L'effet de son inactivation a pu être analysé *in vivo* chez une souche *M.smeg* avec un allèle *inhA* thermosensible. A température non permissive, la biosynthèse des AMs est inactivée avec pour conséquence, l'accumulation d'acides gras produits par FAS-I et la lyse cellulaire (Vilchèze et al., 2000). De manière cohérente, les mêmes phénotypes sont observés chez *M.bovis* BCG traité par de l'INH (Vilchèze et al., 2000), un antituberculeux dont la cible principale est InhA (Banerjee et al., 1994).

## **ii. Les condensases KasA et KasB**

Les  $\beta$ -cétol-Acyl-ACP synthase KasA et KasB catalysent l'étape de condensation entre un acyl-AcpM et un malonyl-AcpM (**Figure 20**), permettant à la chaîne méromycolique en cours de croissance d'être allongée de 2C. Les gènes *kasA* (*rv2245*) et *kasB* (*rv2246*) appartiennent au même opéron, appelé l'opéron *fasII* (ou opéron *kas*), qui incluent également les gènes *fabD* (*rv2242*), *acpM* (*rv2243*) et *accD6* (*rv2247*). Les enzymes KasA et KasB partagent 67% d'identité de séquence et possèdent une spécificité de substrats pour les acyl-AcpM à longues chaînes [au moins 16C (Schaeffer et al., 2001)]. Malgré leur proximité fonctionnelle avec FabH, la condensase initiatrice de FAS-II, les enzymes Kas semblent être impliquées uniquement dans l'élongation de la chaîne méromycolique et non dans l'initiation (Borgaro et al., 2011; Schaeffer et al., 2001). KasA est une enzyme indispensable pour la biosynthèse des AMs et la survie des mycobactéries (Bhatt et al., 2005), alors que KasB est non essentielle (Bhatt et al., 2007a; Carel et al., 2014; Gao et al., 2003).

KasA et KasB ont des spécificités pour des substrats de tailles différentes, ce qui suggère des rôles distincts pour chacune de ces enzymes (Slayden and Barry, 2002). Des

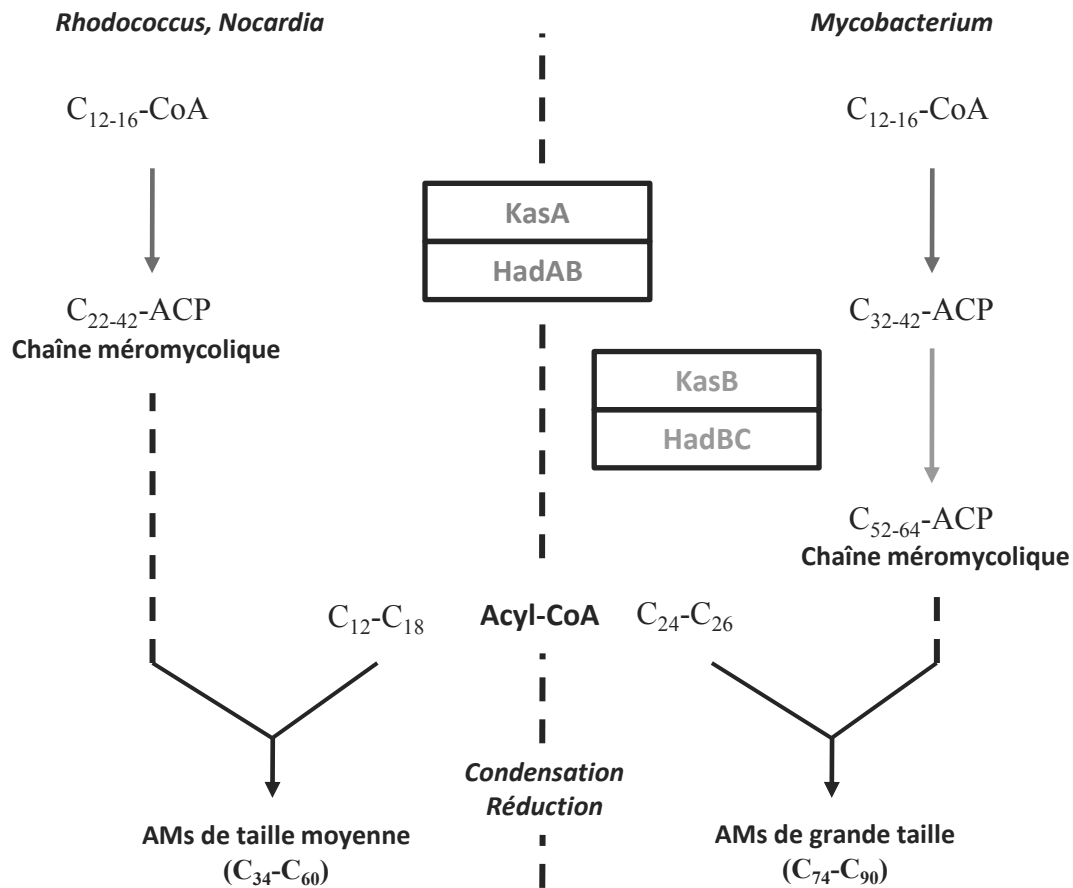


lysats cellulaires de *M.smeg* surproduisant KasA génèrent des acides gras d'une longueur de 40C, alors que la surproduction simultanée de KasA et KasB génère des acides gras d'une longueur de 54C, soit une taille équivalente à celle de la chaîne méromycolique (Slayden and Barry, 2002). Ces données ont conduit à proposer un modèle selon lequel KasA interviendrait au cours des étapes précoces de l'élongation de la chaîne méromycolique, alors que KasB serait impliquée dans l'élongation terminale permettant de générer les chaînes longues. A l'appui de ce modèle, les mutants *kasB* de *Mycobacterium marinum* (*M.mar*), de *M.smeg* et de *M.tb* produisent des AMs plus courts de 2 à 6C (Bhatt et al., 2007a; Carel et al., 2014; Gao et al., 2003). L'absence de KasB modifie aussi la proportion des différentes espèces d'AMs. Par exemple, chez un mutant  $\Delta kasB$  de *M.tb*, l'abondance relative de céto-mycolates diminue sensiblement au profit des  $\alpha$ -mycolates (Bhatt et al., 2007a). De manière intéressante, plusieurs études ont montré que les protéines Kas interagissent directement avec plusieurs méthyltransférases (Cantaloube et al., 2011; Veyron-Churlet et al., 2005) [voir Introduction § IV, F], responsables de l'insertion des décorations sur la chaîne méromycolique [voir Introduction § IV, C, c)]. L'ensemble de ces données suggère donc que l'activité des méthyltransférases pourrait être régulée directement par ces interactions par les condensases KasA et KasB.

L'altération du profil des AMs d'un mutant *kasB* est associée à une déstabilisation de son enveloppe [visible en microscopie électronique (Yamada et al., 2012)], et est corrélée à une augmentation de sa perméabilité aux composés lipophiles et à une sensibilité accrue à plusieurs antibiotiques (Gao et al., 2003). De même, un mutant  $\Delta kasB$  de *M.tb* est incapable d'induire les signes pathologiques de la maladie chez des souris immunocompétentes qui survivent même après 600 jours d'infection, ce qui souligne le rôle fondamental que joue KasB dans la virulence de *M.tb* (Bhatt et al., 2007a).

### **iii. Les déshydratases HadAB et HadBC**

Chez *E. coli*, l'étape de déshydratation de FAS-II est réalisée par les enzymes FabA et FabZ (Rock and Cronan, 1996) dont les orthologues sont absents chez les mycobactéries (Sacco et al., 2007a). Par contre, des orthologues à des hydratases de type eucaryote ont été identifiés *in silico* et leur implication dans la biosynthèse des AMs démontrée expérimentalement à la fois chez *M.tb* (Sacco et al., 2007b) et *M.smeg* (Brown et al., 2007). Cette activité est codée par trois gènes *hadA*, *hadB* et *hadC* organisés probablement en



**Figure 21. Modèle du rôle des hétérodimères HadAB et HadBC dans la biosynthèse des AMs chez les mycobactéries.** Par analogie avec KasA, HadAB interviendrait dans les premiers cycles d'élongation de FAS-II, produisant une chaîne méromycolique de taille moyenne ( $C_{22-42}$ ), ce qui correspond à la taille de chaîne retrouvée chez les espèces du genre *Rhodococcus* et *Nocardia*. Par analogie avec KasB, l'hétérodimère HadBC serait impliqué dans l'élongation finale de la chaîne méromycolique, produisant des chaînes longues ( $C_{52-64}$ ). En conséquence, les AMs produits par les mycobactéries sont plus grands que ceux des espèces du genre *Rhodococcus* et *Nocardia*. Sacco et al, 2007b

opéron. Les produits de ces gènes forment deux types d'hétérodimères (HadA-HadB)<sub>2</sub> et (HadB-HadC)<sub>2</sub>, avec HadB portant l'activité catalytique et HadA et HadC responsables de la spécificité de substrats.

*In vitro*, HadAB présente une activité plus forte sur des substrats carbonés de longueur moyenne, alors qu'HadBC et l'homodimère HadB possèdent une préférence très similaire pour des chaînes plus longues (Sacco, 2007; Sacco et al., 2007b). Si l'homodimère HadB possède une activité sur ces substrats dérivés du CoA, il est en revanche incapable d'utiliser des substrats dérivés de l'ACP d'*E.coli in vitro*, contrairement à HadAB et HadBC. Sachant que les dérivés ACP (ou AcpM) sont les substrats naturels, ces observations suggèrent que seuls les hétérodimères possèdent une activité déshydratase *in vivo* (Sacco, 2007; Sacco et al., 2007b). Par analogie au modèle d'activité des enzymes KasA et KasB, ces travaux ont conduit à proposer que HadAB interviendrait au cours des étapes précoces d'élongation des AMs et que HadBC permettrait de terminer la synthèse pour générer les chaînes longues (**Figure 21**). Cette hypothèse est confortée par un argument supplémentaire. En effet, des espèces bactériennes comme *Rhodococcus sp.* et *Nocardia farcinica* ne produisant que des AMs de longueurs intermédiaires (respectivement C<sub>22-30</sub> et C<sub>32-42</sub>), possèdent les gènes *hadA* et *hadB* mais pas le gène *hadC* (**Figure 21**). Pour valider ce modèle d'activité, il serait nécessaire d'analyser *in vivo* le rôle respectif des protéines Had dans la biosynthèse des AMs.

Les AMs sont essentiels chez *M.tb*. Par conséquent, et de manière cohérente, la délétion du cluster de gènes *hadA-hadB-hadC* est impossible chez *M.tb*, indiquant qu'au moins un des trois gènes est essentiel (Sacco et al., 2007b). Chez *M.smeg*, il a été démontré que le gène *hadB* est essentiel, en accord avec l'idée que seule HadB possède l'activité catalytique (Brown et al., 2007). L'absence d'insertion de transposon dans le gène *hadA* lors de trois expériences différentes de mutagenèse à haute densité suggère que celui-ci est essentiel chez *M.tb* (Griffin et al., 2011; Sassetti et al., 2003; Zhang et al., 2012). Les prédictions sur l'essentialité de *hadC* sont contradictoires, essentiel dans une étude (Griffin et al., 2011) mais non essentiel dans deux autres (Sassetti et al., 2003; Zhang et al., 2012). Par analogie à l'essentialité ou non et aux spécificités de substrats des enzymes KasA et KasB, on peut supposer que l'activité d'HadAB utilisant des substrats courts et moyens soit essentielle (comme KasA) et que celle d'HadBC utilisant des substrats longs ne le soit pas (comme KasB). A l'instar d'un mutant  $\Delta kasB$  de *M.tb*, on pourrait s'attendre à observer chez un mutant *hadC* une corrélation entre les modifications de la structure des AMs, un défaut de structuration de l'enveloppe, une sensibilité accrue à plusieurs antibiotiques, et une capacité





adaptative altérée des bactéries (notamment au cours du processus infectieux). Cette contradiction des prédictions sur l'essentialité ou pas d'*hadC* et malgré les données sur l'activité enzymatique *in vitro*, souligne l'importance de tester par une approche génétique les conclusions issues uniquement d'approches *in silico* et/ou globales et/ou biochimiques.

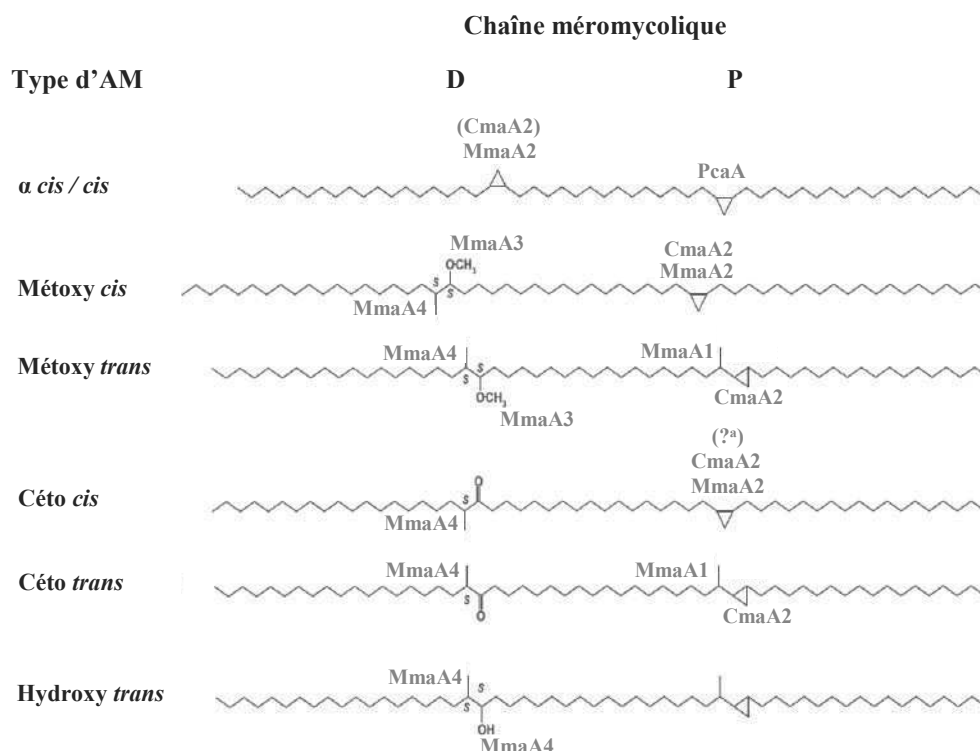
### c) Modification par des méthyltransférases

La chaîne méromycolique est modifiée par l'introduction de groupements fonctionnels (ou décorations). Chez *M.tb*, ces décorations sont des fonctions cyclopropanes, méthoxyles, cétones, méthyles, hydroxyles.

L'introduction des décorations nécessite au préalable la formation de doubles liaisons *trans* aux positions distale et proximale de la chaîne méromycolique (Barry et al., 1998), par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé (Marrakchi et al., 2014). Deux hypothèses principales sont proposées pour expliquer la formation de ces doubles liaisons: **(i)** elles résultent de l'activité d'une désaturase après la synthèse de la chaîne méromycolique, ou **(ii)** elles sont introduites sur la chaîne en cours d'élongation par un mécanisme d'isomérisation (Barry et al., 1998). *M.tb* possède trois gènes codant pour des désaturases potentielles : *desA1*, *desA2* et *desA3*. Si les rôles de DesA1 et DesA2 n'ont pas encore été élucidés, il semblerait que DesA3 soit uniquement impliquée dans la biosynthèse de l'acide oléique (Phetsuksiri et al., 2003). Deux gènes codants pour des isomérases putatives ont été identifiés dans le génome de *M.tb* : *echA10* et *echA11* (Takayama et al., 2005). Cependant, ces gènes sont prédits comme non essentiels (Griffin et al., 2011; Sassetti et al., 2003; Zhang et al., 2012). Or, puisque les AMs sont essentiels à la viabilité des mycobactéries, l'étape d'isomérisation devrait l'être également (Marrakchi et al., 2014). Chez *E.coli*, l'isomérisation est réalisée au cours de l'élongation de la chaîne carbonée par FabA, une déshydratase/isomérase. Par analogie à FabA, il est donc envisageable que chez *M.tb* l'isomérisation soit réalisée par les déshydratases HadAB et/ou HadBC. Cependant, à l'heure actuelle aucune donnée expérimentale ne permet de supporter cette hypothèse. Par conséquent, la ou les enzymes impliquées dans l'introduction des doubles liaisons *trans* sur la chaîne méromycolique chez *M.tb* doivent encore être identifiées.

Une fois ces doubles liaisons *trans* mises en place, les décorations sont introduites par des enzymes appelées méthyltransférases S-adénosyl-méthionie-dépendantes (MTs). *M.tb* code pour 8 MTs: UmaA1, PcaA, CmA1 CmA2, MmaA1, MmaA2, MmaA3 et MmaA4.

A



B

	Décoration introduite	Rôle biologique <i>in vitro</i>	Rôle dans la virulence	Références
<b>PcaA</b> (Rv0470c)	Cyclopropane	-Incapacité du mutant à former des cordes (perte du « cording »)	-Survie des souris infectées par le mutant -Mutant atténué dans les poumons de souris -Diminution de la survie du mutant dans les macrophages	Glickman et al, 2000 Corrales et al, 2012
<b>CmaA2</b> (Rv0503c)	Cyclopropane	ND	-Mort plus rapide des souris infectées par le mutant (phénotype d'hypervirulence), et présentant davantage de granulomes dans les poumons	Glickman et al, 2001 Rao et al, 2006 Barkan et al, 2010
<b>MmaA1</b> (Rv0645c)	Fonction méthyle	-Augmentation de la perméabilité de l'enveloppe au CDC lorsque <i>mmaA2</i> est surexprimé (augmentation de la fluidité de la mycomembrane ?)	ND	Yuan et al, 1997
<b>MmaA2</b> (Rv0644c)	Cyclopropane	ND	ND	Glickman, 2003 Barkan et al, 2010
<b>MmaA3</b> (Rv0643c)	Fonction méthoxyle	-Augmentation de la perméabilité de l'enveloppe au glucose et hausse de la sensibilité à l'AMP et la RIF lorsque <i>mmaA3</i> est surexprimé	ND	Yuan et al, 1998 Dubnau et al, 1998 Behr et al, 2000
<b>MmaA4</b> (Rv0642c)	Fonctions méthyle et hydroxyle	-Incapacité du mutant à former des biofilms -Le mutant est hypersensible à la RIF -Diminution de la perméabilité du mutant au CDC et au glycérol	-Mutant atténué dans les poumons, la rate et le foie de souris	Sambandan et al, 2013 Boissier et al, 2006 Dubnau et al, 2000

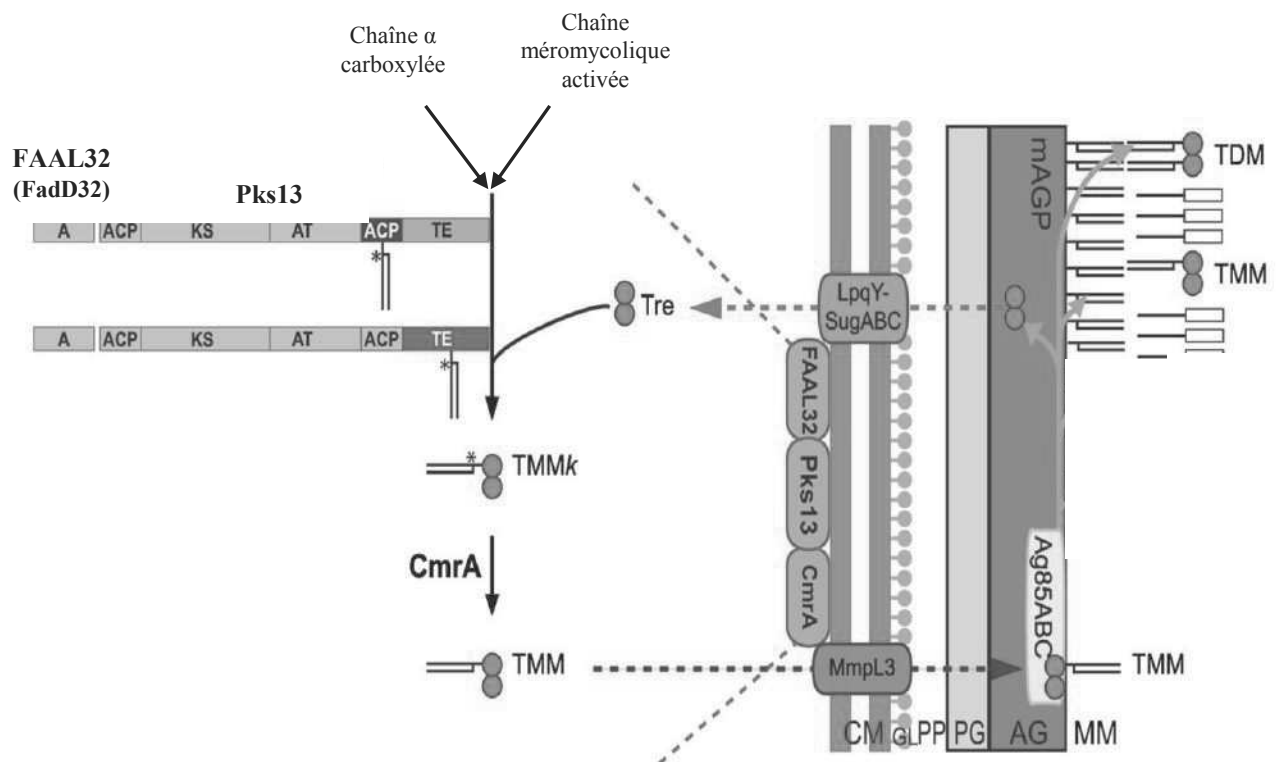
**Figure 22. Activité et rôle des 6 MTs de *M.tb* impliquées dans la biosynthèse des AMs.** En (A) sont représentées les structures des chaînes méromycoliques des différents types d'AMs de *M.tb*. Les décorations sont annotées avec la MT responsable de sa biosynthèse. Lorsque deux enzymes sont listées dont une est entre parenthèses, la MT entre parenthèses joue un rôle secondaire qui n'est mis en évidence qu'une fois le gène codant la 1<sup>ère</sup> enzyme est délété. <sup>a</sup> une 3<sup>ème</sup> enzyme qui n'est pas encore identifiée est impliquée dans cette modification. P: proximale; D: distale. Adapté de Marrakchi et al, 2014; et Barkan et al, 2010. Le rôle biologique *in vitro* et le rôle dans la virulence des 6 MTs impliquées dans la biosynthèse des AMs chez *M.tb* sont décrits dans le tableau (B). ND : non déterminé; AMP : ampicilline; RIF : rifampicine; CDC : chenodeoxycholate.

Aucune MT n'est essentielle à la viabilité de *M.tb* (Barkan et al., 2012; Glickman, 2003). La fonction de chacune de ces enzymes a pu être déterminée au travers l'analyse du profil des AMs produits par les souches délétées d'un ou plusieurs gènes codant ces MTs, et/ou par des souches surexprimant ces MTs. Par ces approches génétiques, 6 MTs ont été montrées comme impliquées dans la modification des AMs: PcaA, CmaA2, MmaA1-4 (**Figure 22A**). Pour certaines de ces MTs, leur rôle biologique *in vitro* et leur contribution dans la virulence ont pu être évalués (**Figure 22B**). Aucune modification dans les décorations des AMs n'a été observée chez les mutants *umaA1* et *cmaA1* (Barkan et al., 2010; Glickman, 2003), par conséquent les rôles de UmaA1 et CmaA1 dans la biosynthèse des AMs restent encore à être déterminés. Cependant, si une image claire commence à émerger quant à l'activité biochimique des MTs, il reste à déterminer l'étape à laquelle celles-ci interviennent : soit pendant la biosynthèse de la chaîne méromycolique, donc probablement de manière coordonnée avec les enzymes de FAS-II, soit après l'activité de FAS-II. Les données d'interaction protéique semblent appuyer la 1<sup>ère</sup> hypothèse [voir Introduction § IV, F].

## D. La condensation "mycolique" finale

La condensation entre la chaîne  $\alpha$  issue de FAS-I et la chaîne méromycolique produite par FAS-II pour donner les AMs est précédée de deux étapes essentielles, la carboxylation de la chaîne  $\alpha$ , et l'activation de la chaîne méromycolique (**Figure 19**).

La carboxylation de l'acyl-CoA en C<sub>24</sub>-C<sub>26</sub>, issue de FAS-I, est réalisée par un complexe ACCase composé de la sous unité carboxytransférase AccD4 et de la sous unité AccA3 (Portevin et al., 2005), dont la spécificité de substrat est en accord avec la taille de la chaîne  $\alpha$  (Oh et al., 2006). La chaîne méromycolique est activée par FadD32 (Portevin et al., 2005). FadD32 (ou FAAL32) est une fatty acyl-AMP ligase qui permet de synthétiser de l'acyl-AMP à partir de longue chaîne d'acides gras (Trivedi et al., 2004). Le produit de FadD32 est ensuite transféré spécifiquement à Pks13 (Gavalda et al., 2009; Léger et al., 2009), une enzyme de la famille des polyketides synthase. Pks13 est une protéine composée de cinq domaines distincts lui permettant de catalyser la condensation entre le chaîne  $\alpha$  carboxylée et la chaîne méromycolique activée, aussi appelée condensation "mycolique" finale (Gavalda et al., 2009). Pour devenir fonctionnelle, Pks13 doit être modifiée post-traditionnellement par l'enzyme PptT [ajout d'un bras P-pant ; (Chalut et al., 2006)]. A la suite de l'étape de condensation, le domaine TE (thioestérase) de Pks13 catalyse le transfert d'une



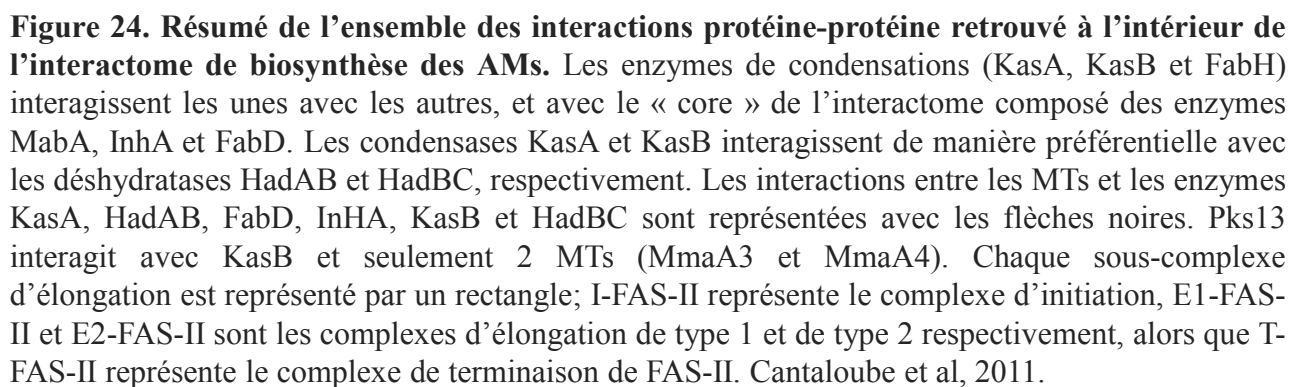
**Figure 23. Modèle proposé des dernières étapes de biosynthèse des AMs et de leur export dans l'enveloppe mycobactérienne.** La chaîne  $\alpha$  carboxylée et la chaîne méromycolique activée par FAAL32 (ou FadD32) sont condensées par l'enzyme Pks13. Pks13 est constituée de 5 domaines distincts : ACP N-terminal (Acyl Carrier Protein), KS (Ketoacyl synthase), AT (Acyltransferase), ACP C-terminal et TE (Thioesterase). Le produit de condensation de Pks13 est un  $\alpha$ -alkyl  $\beta$ -cétoacyl relié au domaine ACP C-terminal par une liaison thioester. Cette liaison est clivée, puis le produit de condensation est transféré par le domaine TE de Pks13 sur une molécule de tréhalose pour former du TMMk. Le TMMk serait transformé en TMM par la réductase CmrA, puis transporté à travers la membrane plasmique par la protéine MmpL3. Le TMM est alors pris en charge par les mycoloytransférases Ag85ABC pour : **(i)** produire le TDM, ou **(ii)** transférer la partie AM du TMM sur le squelette d'arabinogalactane pour former le complexe mAGP. La molécule de tréhalose libérée peut être recyclée en étant réimportée par le transporteur ABC SugABC associé à la lipoprotéine LpqY (Kalscheuer et al, 2010). CM : membrane plasmique; GL : couche granulaire; PP : périplasme; PG : peptidoglycane; AG : arabinogalactane; MM : mycomembrane; \* correspond à la fonction cétone réduite par CmrA. Adapté de Gavalda et al, 2014.

molécule de tréhalose sur le produit de condensation (**Figure 23**), formant un  $\alpha$ -alkyl  $\beta$ -cétoacyl tréhalose (TMMk) (Gavalda et al., 2014). Une étape de réduction est ensuite nécessaire pour former du TMM à partir du TMMk [**Figures 23** ; (Gavalda et al., 2014)]. Cette étape pourrait être catalysée par l'enzyme CmrA (Lea-Smith et al., 2007), mais le substrat de cette enzyme n'a pas encore été caractérisé.

Les gènes *fadD32*, *pks13* et *accD4* sont organisés en opéron chez *M.tb*, renforçant le lien fonctionnel entre ces enzymes. Les trois gènes de cet opéron sont essentiels à la viabilité des mycobactéries (Boldrin et al., 2010; Portevin et al., 2004, 2005). En accord avec ces données, l'opéron *fadD32-pks13-accD4* est conservé chez le génome minimal de *M.leprae*. Contrairement aux mycobactéries, les AMs ne sont pas essentiels chez les corynébactéries, facilitant l'analyse de la biosynthèse des AMs par des approches génétiques chez ces dernières. La délétion de *fadD32*, *pks13* ou *accD4* se traduisait chez *Corynebacterium glutamicum* (*C.glu*) par une incapacité à synthétiser des AMs, corrélée à une altération de la structure de l'enveloppe de la bactérie, démontrant le rôle fondamental de ces gènes dans la biosynthèse des AMs et la structuration de l'enveloppe (Portevin et al., 2004, 2005). Le rôle biologique de AccA3 chez *M.tb* a déjà été discuté précédemment [voir **Introduction § IV, B**]. De manière intéressante, la délétion de *cmrA* chez *C.glu* conduit à l'accumulation de  $\alpha$ -alkyl  $\beta$ -cétoacyl tréhalose (Lea-Smith et al., 2007), ce qui est parfaitement en accord avec l'hypothèse que le tréhalose est l'accepteur final du produit de condensation de Pks13 (Gavalda et al., 2014). Le gène *cmrA* est prédit comme essentiel chez *M.tb* par les deux études de prédictions les plus récentes (Griffin et al., 2011; Zhang et al., 2012).

## E. Transport et devenir des acides mycoliques

La protéine MmpL3 a été identifiée indépendamment par deux équipes, comme étant le transporteur responsable de l'export des AMs à travers la membrane plasmique [**Figures 19 et 23** ; (Grzegorzewicz et al., 2012; Varela et al., 2012)]. *M.tb* possède 14 gènes codant des protéines du type MmpL (Mycobacterial Membrane Protein Large), parmi lesquels seul *mmpL3* a été montré comme essentiel (Domenech et al., 2005). La déplétion de MmpL3 chez un mutant conditionnel de *M.smeg* a pour conséquence une réduction de la production de TDM, et une inhibition du transfert des AMs (toutes espèces confondues) sur l'AG. En parallèle, une accumulation de TMM est observée, suggérant que les AMs sont transportés à travers la membrane plasmique par MmpL3 sous forme de TMM [**Figures 19 et 23** ;



(Grzegorzewicz et al., 2012; Varela et al., 2012)]. Ce résultat est cohérent avec le modèle selon lequel le produit de condensation de Pks13 serait transféré essentiellement sur une molécule de tréhalose [voir **Introduction § IV, D**].

A partir de données d'activité *in vitro* et *in vivo*, plusieurs études ont montré que les protéines sécrétées Ag85A, Ag85B et Ag85C (aussi appelées FbpA, FbpB et FbpC, respectivement) sont des mycoloyltransférases impliquées, non seulement, dans le transfert AMs sur l'AG (Jackson et al., 1999; Puech et al., 2000, 2002), mais également dans la synthèse du TDM à partir de deux molécules de TMM (Belisle et al., 1997; Nguyen et al., 2005). Aucune de ces trois enzymes n'est essentielle individuellement à la survie des mycobactéries, probablement à cause d'une certaine redondance fonctionnelle (Belisle et al., 1997; Puech et al., 2002), bien que l'existence d'autres mycoloyltransférases ne soit pas exclue (Puech et al., 2002). Parmi les trois enzymes Ag85, Ag85C semble jouer un rôle prépondérant dans la mycoloylation de l'enveloppe (Jackson et al., 1999; Puech et al., 2002). En effet, l'inactivation du seul gène codant l'Ag85C (*fbpC*) chez *M.tb* se traduit par une réduction de 40% de la quantité d'AMs liés à l'AG. Cette réduction est corrélée à une augmentation de la perméabilité de l'enveloppe à des composés hydrophobes (chenodeoxycholate) et hydrophiles [glycérol ; (Jackson et al., 1999)]. De manière surprenante, bien que la composition de l'enveloppe d'un mutant *fbpC* soit profondément altérée, sa sensibilité à plusieurs antibiotiques et sa capacité à se multiplier dans les macrophages ne sont pas affectées (Jackson et al., 1999).

## **F. Interactome des enzymes de FAS-II et des méthyltransférases**

A partir de données d'interaction protéique *in vitro* (co-immunoprécipitation) et *in vivo* (double/triple hybrides chez la levure), notre groupe a proposé un modèle d'organisation du système FAS-II, en au moins 3 sous-complexes enzymatiques spécialisés interagissant avec les MTs [**Figure 24** (Cantaloube et al., 2011; Veyron-Churlet et al., 2004, 2005)].

Chaque sous complexe est constitué d'un "core" formé par les réductases InhA, MabA et la transacylase FabD. A ce "core", sont associés une condensase spécifique (FabH, KasA ou KasB) et un des deux hétérodimères de déshydratases (HadAB ou HadBC). Le 1<sup>er</sup> complexe, appelé "complexe d'initiation" (I-FAS-II), est composé de FabH qui permettrait, en réalisant la 1<sup>ère</sup> condensation entre un acyl-CoA issu de FAS-I et un malonyl-AcpM, de fournir au système FAS-II, son substrat. Celui-ci serait allongé jusqu'à une longueur intermédiaire par le 1<sup>er</sup> complexe d'élongation (E1-FAS-II) composé du "core", de KasA et de





l'hétérodimère HadAB. Cette chaîne serait ensuite allongée par le 2<sup>nd</sup> complexe d'élongation (E2-FAS-II) comprenant le "core", KasB et l'hétérodimère HadBC, jusqu'à obtenir une chaîne méromycolique de grande taille (C<sub>48-64</sub>). La chaîne méromycolique néo-synthétisée est alors utilisée pour réaliser la condensation "mycolique" finale par l'enzyme Pks13 présent dans le complexe de terminaison de FAS-II (T-FAS-II) (**Figures 24**). Les protéines appartenant au système FAS-II co-localisent au niveau des pôles de la cellule, suggérant que les pôles soient le siège de la biosynthèse des AMs (Carel et al., 2014), en accord avec le modèle de croissance polaire des mycobactéries (Aldridge et al., 2012; Kang et al., 2008; Thanky et al., 2007).

Des interactions entre les protéines de FAS-II et les MTs ont également été observées (Cantaloube et al., 2011; Veyron-Churlet et al., 2005). De manière intéressante, les MTs interagissent directement et préférentiellement avec les enzymes KasA/KasB, et les hétérodimères HadAB/HadBC. Ces interactions entre les complexes d'élongation et les MTs suggèrent que l'introduction des décorations sur la chaîne méromycolique par les MTs pourrait intervenir au cours de son élongation.

## **G. Régulation de la biosynthèse des acides mycoliques**

### **a) Les mycobactéries contrôlent la composition de leur mycomembrane**

Les bactéries ajustent la composition lipidique de leurs enveloppes en fonction des conditions environnementales, afin d'optimiser leur chance de survie. Les changements de température, la carence, un pH faible, les solvants organiques, et l'augmentation de la salinité sont des conditions souvent décrites comme influençant les proportions relatives des différentes espèces lipidiques de l'enveloppe, ou induisant des modifications structurales de certains acides gras des bactéries (Beney and Gervais, 2001; Cronan, 2002; Ramos et al., 2002; Zhang and Rock, 2008). Ces changements sont interprétés comme nécessaires pour maintenir l'homéostasie lipidique, une fluidité membranaire appropriée et par conséquent, une barrière de perméabilité adéquate. Par ailleurs, la synthèse des acides gras étant énergétiquement très coûteuse, il est nécessaire que cette synthèse soit étroitement contrôlée de manière coordonnée avec la vitesse de croissance des bactéries (Zhang and Rock, 2009).

Chez les mycobactéries, quelques données montrent que la structure et les quantités relatives des AMs qui composent la mycomembrane varient selon les conditions de croissance



et/ou environnementales. Par exemple, *Mycobacterium microti*, qui produit des AMs très similaires à ceux retrouvés chez *M.tb*, présente un rapport céto-mycolates/méthoxy-mycolates élevé en début de phase exponentielle de croissance mais proche de 1 en phase stationnaire (Davidson et al., 1982). Lors de la formation de biofilm chez *M.smeg*, la proportion des AMs à chaîne courte (C<sub>56-68</sub>) augmente significativement au détriment des AMs à chaîne longue (Ojha et al., 2005). De même, pour résister aux variations de température, *M.smeg* module la composition en AMs de sa mycomembrane. Ainsi, lorsque la température passe de 45°C à 20°C, la proportion d'époxy et d' $\alpha$ -mycolates à courte chaîne augmente au détriment des chaîne longue (Baba et al., 1989). *M.smeg* produit des  $\alpha$ -mycolates avec une fonction cyclopropane à 25°C, alors qu'à 37°C ces AMs ne sont pas cyclopropanés (Alibaud et al., 2010). En réponse à l'augmentation de température, *M.smeg* produit davantage d'AMs en configuration *trans*, qui ont une température de fusion plus élevée (Liu et al., 1996). Chez *M.bovis* BCG, l'entrée en phase non-réplivative, induite par la déplétion en oxygène, s'accompagne d'une accumulation importante d' $\alpha$ -mycolates et la quasi disparition des céto-mycolates (Shui et al., 2007). L'adaptation de *M.tb* à la vie intra-macrophagique s'accompagne également d'un changement de la composition en AMs de la mycomembrane. Notamment la proportion de céto-mycolates y est plus forte qu'en condition de croissance *in vitro* (Yuan et al., 1998). Comme évoqué précédemment, les céto-mycolates permettent d'induire la différenciation des macrophages infectés en macrophages spumeux (MS), lesquels pourraient constituer un environnement favorisant la survie à long terme de la bactérie à l'intérieur de son hôte [voir Introduction § III, B, b)]. Ainsi, la capacité de *M.tb* à moduler les propriétés de sa mycomembrane participe certainement à son succès en tant qu'agent pathogène. Les AMs étant les constituants majeurs de cette membrane, une bonne connaissance de la régulation de leur biosynthèse permettrait, par conséquent, de révéler de nouvelles et/ou stratégie de lutte contre la tuberculose.

S'il existe dans la littérature des données, dont certaines assez anciennes, indiquant un contrôle de la structure des AMs en fonction des conditions de croissance, les connaissances sur les acteurs responsables de cette régulation chez les mycobactéries sont plus récentes et parcellaires.

## **b) Les régulateurs transcriptionnels**



Au cours des dernières années, quelques facteurs de transcription régulant directement des gènes de biosynthèse des AMs ont été identifiés : MabR, FasR, FadR et LtmA (Biswas et al., 2013; Li and He, 2012; Mondino et al., 2013; Salzman et al., 2010).

*i.* MabR (Rv2242, Mycolic acid biosynthesis Regulator)

MabR a été le 1<sup>er</sup> régulateur de gènes de biosynthèse des AMs identifié chez les mycobactéries (Salzman et al., 2010). C'est un répresseur des gènes de l'opéron *fabD-acpM-kasA-kasB* (appelé opéron *fasII*) et du gène *fas* (codant pour l'activité FAS-I). MabR se fixe à une séquence palindromique de 21pb dans la région promotrice en amont de *fabD*. Cette séquence est absente dans la région promotrice de *fas*, suggérant que la régulation de *fas* par MabR est indirecte. Le gène *mabR* est essentiel chez *M.smeg* et probablement aussi, chez *M.tb* (Griffin et al., 2011; Zhang et al., 2012). Sa surexpression provoque chez *M.smeg* une réduction de la synthèse *de novo* des AMs associée à une accumulation d'acyl-CoA en C<sub>24</sub>, issu de l'activité de FAS-I. Chez *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, les acyl-CoA à longues chaînes sont des effecteurs capables de modifier la capacité de liaison à l'ADN de régulateurs transcriptionnels de gènes de biosynthèse de lipides (FadR pour *E.coli*, et DesT pour *P.aeruginosa*), et donc de contrôler leur activité de régulation [pour revue (Zhang and Rock, 2009)]. Par analogie, chez les mycobactéries, les acyl-CoA en C<sub>24</sub> pourraient être un ligand permettant de contrôler la liaison à l'ADN de MabR et ainsi participer au maintien de l'homéostasie lipidique (Salzman et al., 2010). Cependant, à ce jour, aucune donnée ne permet de confirmer cette hypothèse. De même, le rôle biologique de MabR et la raison pour laquelle ce régulateur est essentiel ne sont pas connus.

*ii.* FasR (Rv3208, Fatty acids synthesis Regulator)

FasR est un régulateur de la famille TetR (Ramos et al., 2005). Il active de manière directe l'expression de l'opéron constitué du gène *fas* et du gène *acpS* (Mondino et al., 2013). FasR reconnaît spécifiquement une séquence palindromique de 12pb présente en trois copies dans la séquence intergénique en amont de *fas*. Ces motifs de liaison à l'ADN sont localisés à une distance importante du +1 de transcription de l'opéron *fas-acpS* (entre 200 et 300pb), ce qui est inhabituel pour un régulateur de la famille TetR (Ramos et al., 2005). De manière intéressante, la capacité de liaison à l'ADN de FasR est inhibée par les acyl-CoA à longue chaîne (>C<sub>16</sub>-CoA), suggérant qu'*in vivo* les produits de FAS-I puissent être des ligands de FasR contrôlant son activité de régulation. Le gène *fasR* est essentiel chez *M.smeg* et



probablement aussi chez *M.tb* (Griffin et al., 2011; Zhang et al., 2012). La déplétion conditionnelle de *fasR* a pour conséquence chez *M.smeg* une diminution de la synthèse des AMs mais aussi des lipides "extractibles", ce qui est en accord avec les données d'expression montrant que FasR est un activateur transcriptionnel de l'opéron *fas-acpS*. La nécessité de maintenir en permanence l'expression de *fas* et *acpS*, deux gènes essentiels (Chalut et al., 2006; Zimhony et al., 2004), pourrait expliquer pourquoi le régulateur FasR est lui-même essentiel pour la viabilité. La recherche *in silico* à l'échelle du génome du motif de liaison pour FasR n'a donné aucun résultat, suggérant que l'opéron *fas-acpS* soit l'unique cible de FasR (Mondino et al., 2013). Puisque FAS-I est central à la biosynthèse de l'ensemble des lipides de la cellule, au-delà des AMs, l'identification des signaux environnementaux conduisant à l'activation de la voie de signalisation conduisant à FasR permettrait d'avoir une vision intégrée de la régulation des AMs. Mais à ce jour, ces signaux restent à être découverts.

### **iii. FadR<sub>M.tb</sub> (Rv0494, Fatty acid metabolism Regulator)**

Rv0494 est le facteur transcriptionnel de *M.tb* présentant le meilleur score d'alignement avec la protéine FadR de *E.coli*, un régulateur connu pour coordonner la synthèse et la dégradation des acides gras [pour revue (Zhang and Rock, 2009)]. Rv0494 se fixe sur une séquence opératrice en amont de *fabD* très similaire à la séquence consensus des opérateurs de FadR chez *E.coli* et, par analogie, Rv0494 a été nommé FadR<sub>M.tb</sub> (Biswas et al., 2013). La capacité de liaison à l'ADN de FadR<sub>M.tb</sub> est inhibée spécifiquement par les acyl-CoA à longue chaîne (en C<sub>18</sub>). La surexpression de *fadR<sub>M.tb</sub>* chez *M.bovis BCG* inhibe l'expression des gènes *fabD*, *acpM*, *kasA* et *kasB*, indiquant que FadR<sub>M.tb</sub> est un répresseur transcriptionnel de l'opéron *fasII*. De manière intéressante, d'autres gènes de biosynthèse des AMs pourraient être également régulés par FadR<sub>M.tb</sub>. En effet, des sites potentiels de liaison du régulateur sont présents en amont des gènes *fas* et *fbpC* (codant pour l'Ag85C) (Biswas et al., 2013). Le gène *fadR<sub>M.tb</sub>* est prédit comme n'étant pas essentiel chez *M.tb* (Griffin et al., 2011; Sassetti et al., 2003; Zhang et al., 2012). Son rôle biologique reste à être déterminé.

### **iv. LtmA (MSMEG\_6479, Lipid transport and metabolism Activator)**

LtmA est un régulateur global découvert chez *M.smeg* (MSMEG\_6479) (Li and He, 2012). Le régulon de LtmA comprend de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme et le transport lipidique (37/330), parmi lesquels les gènes *hadABC* (codant pour l'activité déshydratase de FAS-II) et *fas*. Le gène *fas* et le cluster de gènes *hadABC* sont activés de





manière directe par LtmA. LtmA reconnaît spécifiquement une séquence palindromique de 12pb présente en amont de ses gènes cibles, et sa liaison à l'ADN est favorisée par le cyclic-di-GMP. Le régulateur LtmA n'est pas essentiel à la viabilité de *M.smeg*. De manière intéressante, un mutant  $\Delta ltmA$  est plus sensible que la souche *Wt* à deux antibiotiques : la RIF et l'INH. A l'inverse, la souche sur-exprimant *ltmA* est plus résistante que la souche *Wt* à ces drogues, indiquant que le niveau de sensibilité de *M.smeg* à la RIF et l'INH est dépendant du niveau d'expression du régulateur. De même, la surexpression de *ltmA* rend moins sensible *M.smeg* à la coloration au crystal violet et affecte la morphologie des colonies (colonies plus lisses). L'ensemble de ces phénotypes peuvent être expliqués par une modification de la perméabilité ou une altération des propriétés physico-chimique de l'enveloppe, causées par une modification de sa composition. Les auteurs proposent que ces phénotypes soient en grande partie la conséquence d'une modification du métabolisme des AMs, qui serait contrôlé par LtmA (Li and He, 2012). Un orthologue, Rv0767c, présent chez *M.tb*, reconnaît la même séquence opératrice et sa liaison à l'ADN est également stimulée par le cyclic-di-GMP (Li and He, 2012). A l'instar de LtmA chez *M.smeg*, Rv0767c est prédit comme non essentiel (Griffin et al., 2011; Sasseti et al., 2003; Zhang et al., 2012). Enfin, des séquences potentiellement reconnues par LtmA/Rv0767c sont également présentes dans les régions promotrices de *fas* et du cluster *had*, ce qui suggère que la régulation est conservée chez *M.tb*. Le contexte environnemental dans lequel LtmA et Rv0767c sont activés reste à être identifié.

### c) Contrôle post-traductionnel

La biosynthèse des AMs est également régulée à un niveau post-traductionnel. A l'heure actuelle, deux types de régulations post-traductionnelles sont décrits dans la littérature. (i) La régulation par GroEL1 et EccA1 qui s'effectue via leur interaction physique directe avec certaines enzymes de biosynthèse des AMs (Joshi et al., 2012; Ojha et al., 2005) ; et (ii) le contrôle de l'activité de plusieurs enzymes de biosynthèse des AMs par phosphorylation (Bhatt et al., 2007b; Molle and Kremer, 2010).

#### i. La régulation par les protéines GroEL1 et EccA1

##### ❖ GroEL1

GroEL1 fait partie de la famille des protéines chaperonnes dont le rôle est de faciliter le repliement des protéines et d'empêcher la formation d'agrégats protéiques dans le cytosol (Sielaff et al., 2011). GroEL1 n'est pas essentielle à la viabilité des mycobactéries (Griffin et



al., 2011; Ojha et al., 2005; Zhang et al., 2012). La délétion du gène *groEL1* n'affecte pas la croissance planctonique mais empêche la formation de biofilms matures chez *M.smeg*. De manière intéressante, lors de la formation de biofilm la quantité de protéine KasA produite par le mutant *ΔgroEL1* est sensiblement réduite, en corrélation avec une diminution de la biosynthèse des AMs (Ojha et al., 2005). De plus, KasA interagit physiquement avec GroEL1 spécifiquement dans les biofilms (pas en croissance planctonique). Comme évoquée précédemment, la formation de biofilm chez *M.smeg* s'accompagne préférentiellement d'une augmentation de la synthèse d'AMs à courte chaîne au détriment des AMs à chaîne longue [voir Introduction § IV, G, a)]. L'ensemble des données suggère que GroEL1 est une protéine chaperonne qui, via son interaction avec KasA, participe à la régulation de la biosynthèse des AMs, pour assurer la formation de biofilms matures (Ojha et al., 2005).

#### ❖ EccA1

EccA1 est une des trois ATPases appartenant au système ESX-1 de sécrétion de protéines (Champion et al., 2009). Son activité est essentielle pour la sécrétion d'ESAT-6 (Joshi et al., 2012), un facteur de virulence important de *M.tb* (Gao et al., 2004; van der Wel et al., 2007). EccA1 interagit *in vivo* avec plusieurs enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides, en particulier des AMs: Pks13, KasA, KasB et MmaA4. L'inactivation du gène *eccA1* par insertion de transposon chez *M.mar* a pour conséquence une diminution de 30 à 40% de la production d'AMs (toutes espèces confondues) (Joshi et al., 2012). L'expression de la version *Wt* du gène *eccA1* chez cette souche mutante permet de compléter le défaut de production d'AMs, contrairement à l'expression de l'allèle codant pour un mutant ponctuel d'EccA1 incapable d'hydrolyser l'ATP. Ces données montrent que l'activité ATPase de EccA1 est nécessaire pour la production optimale des AMs chez *M.mar* (Joshi et al., 2012). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le mécanisme précis permettant à EccA1 de stimuler la synthèse des AMs chez les mycobactéries.

#### ii. La régulation par la phosphorylation

A ce jour, le contrôle de l'activité des enzymes de biosynthèse des AMs par la phosphorylation est le mécanisme de régulation le plus décrit dans la littérature [pour revues (Bhatt et al., 2007b; Molle and Kremer, 2010). Ces phosphorylations sont réalisées par des sérine/thréonine kinases (STPKs), des enzymes longtemps considérées comme étant spécifiques aux eucaryotes mais qui sont, en définitive, aussi très représentées chez les



procaryotes (Bakal and Davies, 2000). *M.tb* possède 11 kinases de type STPKs (Av-Gay and Everett, 2000). Parmi les substrats de ces STPKs, on trouve de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme de l'enveloppe de *M.tb*, dont plusieurs dans la biosynthèse des AMs [pour revue (Molle and Kremer, 2010)].

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont montré que l'activité *in vitro* des enzymes KasA, HadAB, HadBC, InhA, MabA, FabH et PcaA était régulée négativement par des STPKs (Corrales et al., 2012; Khan et al., 2010; Molle et al., 2006, 2010; Slama et al., 2011; Veyron-Churlet et al., 2009, 2010), alors que l'activité de KasB est, quant à elle, stimulée (Molle et al., 2006), mais ce dernier résultat a été remis en cause (Vilchèze et al., 2014). Grâce à l'identification des résidus phosphorylés et la construction de souche mutantes produisant des versions "phosphomimétiques" de ces enzymes (mimant une phosphorylation constitutive), la pertinence physiologique de la phosphorylation des protéines InhA, MabA, PcaA et KasB a pu être évaluée (Corrales et al., 2012; Khan et al., 2010; Molle et al., 2010; Veyron-Churlet et al., 2010; Vilchèze et al., 2014). Ainsi, la surexpression de l'allèle *mabA* phosphomimétique chez *M.bovis BCG* a pour conséquence une forte inhibition de la croissance, corrélée à une diminution de la biosynthèse *de novo* d'AMs (Veyron-Churlet et al., 2010). Parallèlement, deux équipes ont montré indépendamment que l'allèle *inhA* phosphomimétique ne permet de restaurer, ni la croissance, ni le défaut de production d'AMs d'un mutant conditionnel *inhA* de *M.smeg* (Khan et al., 2010; Molle et al., 2010). Enfin, Corrales et collaborateurs ont montré que l'expression de l'allèle *pcaA* phosphomimétique ne permet pas de restaurer l'absence de production  $\alpha$ -mycolates chez un mutant  $\Delta$ *pcaA* de *M.bovis BCG*, contrairement à l'expression de l'allèle *pcaA* phosphoablative (codant pour une version non phosphorylable de PcaA) (Corrales et al., 2012). Ces études montrent que la phosphorylation *in vivo* conduit à une forte inhibition de l'activité de ces trois enzymes, voire à leur inactivation, en accord avec les mesures d'activité *in vitro*. Les mesures de l'activité de condensation *in vitro* de KasB suggéraient initialement une activation de cette enzyme par les STPKs (Molle et al., 2006). Cependant, une étude récente a montré qu'une souche de *M.tb* dont l'allèle *kasB* *Wt* est remplacé par un allèle *kasB* phosphomimétique a un phénotype similaire à celui de la souche mutante  $\Delta$ *kasB* (profil des AMs et virulence), suggérant que la phosphorylation inhibe également l'activité de KasB *in vivo* (Vilchèze et al., 2014), comme pour les autres enzymes de biosynthèse des AMs (KasA, HadAB, HadBC, InhA, MabA, FabH et PcaA).



De manière intéressante, Slama et collaborateurs ont observé que la phosphorylation des hétérodimères HadAB et HadBC était dépendante de la phase de croissance. Ainsi, les enzymes HadAB et HadBC sont davantage phosphorylées en phase stationnaire qu'en phase exponentielle (Slama et al., 2011). Ces données suggèrent que la biosynthèse de la chaîne méromycolique est inhibée (ou stoppée) lorsque la bactérie ne se réplique plus, en accord avec un arrêt de la biosynthèse des AMs en phase stationnaire (Lacave et al., 1989).

La phosphorylation des enzymes de biosynthèse des AMs est un mécanisme de régulation assez bien décrit dans la littérature, cependant plusieurs interrogations subsistent. *In vitro* les enzymes de biosynthèse des AMs peuvent être phosphorylées par plusieurs STPKs, mais qu'en est-il *in vivo* ? La spécificité de substrat des STPKs est-elle aussi large ? En outre, quel est (sont) le(s) substrat(s) de chaque STPK *in vivo* ? L'analyse du profil des AMs et la mise en évidence du phosphoprotéome de souches délétées ou sur-exprimant un ou plusieurs gènes codant une STPK, pourraient donner des éléments de réponse. De même, les signaux environnementaux activant ces STPKs restent à être identifiés.





## V. Objectifs de thèse

L'importance des AMs pour la physiologie de la bactérie et sa virulence a fait de la compréhension de leur biosynthèse et de la régulation de celle-ci un enjeu majeur pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les déshydratases HadABC du complexe FAS-II sont les dernières enzymes de biosynthèse des AMs à avoir été découvertes. Elles sont organisées en deux sous unités distinctes, les hétérodimères HadAB et HadBC avec, HadAB impliqué dans les étapes précoces de l'élongation de la chaîne méromycolique et, HadBC pour finir cette synthèse (Sacco et al., 2007b). Ce modèle étant basé uniquement sur des données d'expérimentation *in vitro*, le 1<sup>er</sup> volet des travaux de ma thèse a eu pour but par une approche génétique d'étudier le rôle respectif des sous unités dans la biosynthèse des AMs *in vivo*. En parallèle, pour rationaliser leur intérêt comme cibles thérapeutiques, j'ai essayé de définir le rôle de ces sous unités pour les capacités adaptatives, la résistance aux antibiotiques et la pathogénicité de la bactérie.

Si la biochimie et l'enzymologie de la biosynthèse des AMs sont relativement bien connues, les données concernant la régulation de celles-ci sont très parcellaires. Le 2<sup>nd</sup> volet de mes travaux de thèse a eu pour but d'étudier l'expression et la régulation des gènes de biosynthèse des AMs, en particulier des gènes *hadABC*. Pour cela, je me suis appuyé sur des approches de génétique moléculaire mais également, de bio-informatique pour rationaliser l'organisation génétique du locus *hadABC*. Enfin, le dernier volet des travaux de ma thèse avait pour but d'obtenir une vision cellulaire intégrée de la régulation des gènes de biosynthèse des AMs. Pour cela, j'ai analysé le rôle biologique d'un régulateur transcriptionnel global, Rv0081.



# Résultats



# I. Rôle biologique des sous-unités des déshydratases HadAB et HadBC chez *M.tuberculosis* et *M.smegmatis*

## A. Résumé des articles

*Jamet et al* (p.68) et *Slama et al* (p.69)

Les AMs sont essentiels à la viabilité et contribuent à la virulence des mycobactéries. Ils sont les constituants les plus abondants de la mycomembrane et, de ce fait, ont un rôle majeur dans la haute imperméabilité de celle-ci et donc, dans la résistance intrinsèque des mycobactéries aux antibiotiques. A cause de ces caractéristiques, la compréhension de la biosynthèse des AMs est un enjeu important pour le développement d'antituberculeux. Aujourd'hui, les réactions enzymatiques conduisant à cette biosynthèse sont relativement bien connues, même s'il subsiste quelques zones d'ombre dont notamment l'identification de(s) l'enzyme(s) permettant l'introduction des doubles liaisons *trans*et l'étape durant laquelle les différentes MTs introduisent les groupements fonctionnels sur la chaîne méromycolique.

Pendant longtemps, l'étape de déshydratation est restée la pièce manquante du système FAS-II, jusqu'à ce que notre équipe chez *M.tb* (Sacco et al., 2007b) et celle de G. Besra chez *M.smeg* (Brown et al 2007) identifient et caractérisent les déshydratases HadABet HadBC. Les travaux *in vitro*ont conduit à proposer un modèle selon lequel le complexe HadAB interviendrait au cours des étapes précoces d'élongation des AMs et le complexe HadBC finirait la synthèse pour générer les chaînes longues [voir Introduction § IV, C, b), iii]. La sous-unité HadB porterait l'activité catalytique et les sous-unités HadA/HadC détermineraient la spécificité de substrats, respectivement des substrats courts et moyens pour HadA et longs pour HadC (Sacco et al., 2007b). Cependant, même si ce modèle d'activité des enzymes Had est convaincant, il ne repose que sur des arguments indirects (*i.e.* l'analogie avec le modèle d'activité des enzymes KasAB, et l'absence de *hadC* chez les genres *Rhodococcus* et *Nocardia*) et sur des données expérimentales qui présentent quelques limites. En effet, pour des raisons techniques les tests d'activité *in vitro* des enzymes Had ont été réalisés qu'avec des substrats carbonés de longueur C4 à C20, alors que la longueur de la chaîne méromycolique peut atteindre une taille de C64. D'autre part, les substrats utilisés étaient des dérivés du CoA, or les substrats naturels des enzymes Had sont des chaînes carbonées dérivées de l'ACP (ou AcpM). Par conséquent, pour valider le modèle, il était nécessaire d'analyser *in vivo* le rôle respectif des protéines Had dans la biosynthèse des AMs. Par



ailleurs, si l'activité déshydratase est essentielle à la viabilité, seule la sous-unité HadB a été démontrée comme étant indispensable à la survie (Sacco et al., 2007b; Brown et al 2007). De même, aucune donnée sur la contribution des différentes sous-unités des déshydratases aux propriétés physico-chimiques de l'enveloppe ainsi qu'à la virulence de *M.tb* n'a été rapportée dans la littérature.

Le 1<sup>er</sup> article (p. 68) présente un travail réalisé chez *M.smegmatis*. Par une approche génétique, nous avons montré que ni l'inactivation de HadA, ni celle de HadC ou celle des deux simultanément n'affectaient la viabilité de la bactérie et que, par conséquent, seule HadB était essentielle. Cela suggérerait donc que soit HadB pouvait seule maintenir un niveau d'activité de synthèse des AMs compatible avec la viabilité ou qu'il existe des fonctions redondantes à HadA et/ou HadC. Cependant, l'absence de HadC et dans une moindre mesure celle d'HadA ont eu des conséquences dramatiques sur les propriétés physico-chimiques et de perméabilité de l'enveloppe. Cette altération de l'enveloppe a fortement modifié la physiologie et la capacité adaptative de la bactérie. Celle-ci formait des colonies lisses, présentait un défaut de motilité et de capacité à développer des biofilms. La bactérie est devenue hypersensible aux températures basses et hautes ainsi qu'à différents antibiotiques incluant des antituberculeux. A l'inverse, la bactérie est devenue plus résistante aux détergents.

Le 2<sup>nd</sup> article (p. 69) présente un travail réalisé chez *M.tb*. Le travail s'est focalisé sur le rôle de HadC dans la biosynthèse des AMs et dans la virulence de la bactérie. L'observation à l'origine de travail était la présence d'une mutation de décalage de phase en début du gène *hadC* dans la souche H37Ra, une dérivée avirulente de la souche H37Rv de *M.tb* dont le profil des AMs est profondément altéré, avec notamment une production réduite des AMs oxygénés dont au moins la moitié portent une décoration supplémentaire. En délétant complètement le gène *hadC* à la fois chez H37Ra et H37Rv, nous avons pu confirmer que l'altération des AMs chez H37Ra était effectivement liée à un allèle inactif de *hadC*. Par ailleurs, ce travail a mis en évidence que HadC était nécessaire à la synthèse d'une catégorie très minoritaire de chaînes méromycoliques extrêmement longues avec de 9 à 13C supplémentaires. Ce travail a par conséquent confirmé le modèle issu des données biochimiques que HadC permettait la synthèse de chaînes longues. Il a aussi mis en évidence une relation fonctionnelle entre HadC et les activités de modification de la chaîne méromycolique. Par ailleurs, il a révélé en collaboration avec l'équipe de **R. Brosch (Institut Pasteur, Paris)**, par l'utilisation d'un modèle d'infection murin que HadC bien que non-





essentielle à la viabilité était un déterminant important de la virulence de H37Rv et explique en partie la diminution de virulence de la souche H37Ra.



**B. Article :** "Non-essential mycolic acids biosynthesis genes *hadA* and *hadC* contribute to the physiology and fitness of *Mycobacterium smegmatis*"



RESEARCH ARTICLE

# The Non-Essential Mycolic Acid Biosynthesis Genes *hadA* and *hadC* Contribute to the Physiology and Fitness of *Mycobacterium smegmatis*

Stevie Jamet<sup>1,2</sup>, Nawel Slama<sup>1,2\*</sup>, Joana Domingues<sup>1,2</sup>, Françoise Laval<sup>1,2</sup>, Pauline Texier<sup>1,2\*</sup>, Nathalie Eynard<sup>1,2</sup>, Annaik Quémard<sup>1,2</sup>, Antonio Peixoto<sup>1,2</sup>, Anne Lemassu<sup>1,2</sup>, Mamadou Daffé<sup>1,2</sup>, Kaymeuang Cam<sup>1,2\*</sup>

**1** Centre National de la Recherche Scientifique, IPBS, UMR 5089, F-31077 Toulouse, France, **2** Univ. Toulouse, UPS, F-31000 Toulouse, France

\* Current address: Centre National de la Recherche Scientifique, LMGM, UMR 5100, F-31000 Toulouse, France

\* [kaymeuang.cam@ipbs.fr](mailto:kaymeuang.cam@ipbs.fr)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Jamet S, Slama N, Domingues J, Laval F, Texier P, Eynard N, et al. (2015) The Non-Essential Mycolic Acid Biosynthesis Genes *hadA* and *hadC* Contribute to the Physiology and Fitness of *Mycobacterium smegmatis*. PLoS ONE 10(12): e0145883. doi:10.1371/journal.pone.0145883

**Editor:** Riccardo Manganelli, University of Padova, Medical School, ITALY

**Received:** October 5, 2015

**Accepted:** December 9, 2015

**Published:** December 23, 2015

**Copyright:** © 2015 Jamet et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** SJ Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, JD a European Respiratory Society/Marie Curie Fellowship, AP a Marie Curie International Incoming Fellowship. This work was supported by institutional grants from the Centre National de la Recherche Scientifique.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Gram positive mycobacteria with a high GC content, such as the etiological agent of tuberculosis *Mycobacterium tuberculosis*, possess an outer membrane mainly composed of mycolic acids (MAs), the so-called mycomembrane, which is essential for the cell. About thirty genes are involved in the biosynthesis of MAs, which include the *hadA*, *hadB* and *hadC* genes that encode the dehydratases Fatty Acid Synthase type II (FAS-II) known to function as the heterodimers HadA-HadB and HadB-HadC. The present study shows that *M. smegmatis* cells remain viable in the absence of either HadA and HadC or both. Inactivation of HadC has a dramatic effect on the physiology and fitness of the mutant strains whereas that of HadA exacerbates the phenotype of a *hadC* deletion. The *hadC* mutants exhibit a novel MA profile, display a distinct colony morphology, are less aggregated, are impaired for sliding motility and biofilm development and are more resistant to detergent. Conversely, the *hadC* mutants are significantly more susceptible to low- and high-temperature and to selective toxic compounds, including several current anti-tubercular drugs.

## Introduction

*Mycobacterium tuberculosis*, the etiological agent of tuberculosis, infects one-third of the world population with 9 million new cases and 1.5 million people dying each year from this disease [1]. This failure is primarily due to the capability of the pathogen to develop a non-replicating persistent drug-tolerant form [2,3,4] and to the outbreak of multi-drug and total-drug resistant strains [5,6,7]. The main reason to the development of resistance is the poor compliance with medical treatments due to the side-effects on everyday wellbeing and the duration of treatments [8]. There is therefore an urgent need finding new drugs with highly short-time efficiency [9] or increasing the efficiency of existing drugs [10,11].

*M. tuberculosis* has a unique cell envelope, with a highly efficient permeability outer membrane barrier crucial to its viability and virulence. This so-called mycomembrane is composed of long-chain (up to C100) fatty acids, called mycolic acids (MAs), whose biosynthesis is targeted by several major anti-tubercular drugs [12,13]. In mycobacteria, the synthesis of MAs involved two distinct Fatty Acid Synthases (FAS), *i.e.* the eukaryote-like multifunctional single protein FAS-I and the bacterial-like multi protein complex FAS-II [13]. The HadA-HadB and HadB-HadC heterodimers of the FAS-II complex perform a key dehydration reaction [14,15]. Enzymatic assays have shown that HadA and HadC subunits are involved in the substrate specificity, bringing either short-/medium- or long-size substrates to the catalytic activity of HadB, respectively [14]. The *hadABC* knock-out mutant in *M. tuberculosis* was shown to be non-viable [14] and comprehensive transposon mutagenesis has concluded that *hadA* and *hadB*, but not *hadC*, are essential for cell viability [16,17], although so far only the essentiality of *hadB* in *M. smegmatis* has been confirmed [15], while the non-essentiality of *hadC* has been shown in *M. tuberculosis* [18]. Nevertheless, the key dehydration step for the synthesis of MAs has stimulated the search for drugs that would target the Had enzymes. Indeed, two anti-tubercular drugs used in the sixties, Thioacetazone and Isoxyl, have recently been shown to target HadC and HadA [19]. Although both drugs are barely used because of either a low efficacy (for Isoxyl [20] or toxic side-effects (for Thioacetazone [21]) they underscore the fact that the proteins Had are druggable targets for fighting tuberculosis.

*M. smegmatis*, a fast-growing and safer-to-handle species, has been widely used as a surrogate of the highly pathogenic *M. tuberculosis*. This is based on the assumption of the conservation of the basic functions in both species, such as the building of the mycomembrane. As a consequence, a better understanding of *M. smegmatis* physiology would benefit to the knowledge of *M. tuberculosis* physiology. Notwithstanding *M. smegmatis* belongs to the nontuberculous mycobacteria (NTM) complex and as such *per se* is also an opportunistic pathogen for humans and animals [22,23,24,25]. Therefore any further understanding of *M. smegmatis* might also give new hints to better fight against hardly-cured diseases due to NTM. In this study, we decipher the respective biological role of the HadABC dehydratase subunits and show that *M. smegmatis* *hadA* and *hadC* genes are not essential for cell viability but play a major role in the physiology and adaptive response of the bacteria.

## Materials and Methods

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Strains and Plasmids used in this study are listed in Table 1. For liquid cultures, mycobacteria strains were grown in Middlebrook 7H9 medium (Difco) containing 0.05% Tween-80, 0.2% glycerol, 10% ADC (Difco) and the appropriate antibiotics (Kanamycin 37.5 µg/ml, Hygromycin 150 µg/ml). For solid medium, Tween-less Middlebrook 7H10 broth supplemented by 0.5% glycerol and 10% OADC (Difco) was used. When required, Zeocin was added at 15 µg/ml. For *E. coli* growth, Luria-Bertani medium (Invitrogen) was used with antibiotics when required (Kanamycin 37.5 µg/ml, Hygromycin 150 µg/ml). To induce the *tetROp* promoter from the pGBT plasmid and its derivatives, Tetracycline (20 ng/ml) was also added to the liquid and solid media.

### DNA manipulation

Molecular biology materials were used as recommended by the manufacturers: DNA purification (Quiagen), enzyme restrictions and T4 DNA ligase (Fermentas and Biolabs), PCR with the phusion polymerase (Finnzyme), and pJET1.2 cloning kit (Fermentas). DNA inserts were checked by sequencing (MillGen).

**Table 1. List of strains and plasmids.**

Bacterial strains	description	sources
mc2 155	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> strain	[26]
$\Delta hadC$	native copy of MSMEG_1342 replaced by <i>Sh ble</i> (ZeoR)	This work
$\Delta hadABC$ pABC	native copy of MSMEG_1340/1341/1342 operon replaced by <i>Sh ble</i> (ZeoR), and carrying the pABC plasmid	This work
MC1061 <i>recA</i>	<i>E. coli</i> cloning strain	Our collection
<b>Plasmids</b>		
pJV53	Kan <sup>R</sup> , Plasmid expressing the recombineering proteins	[27]
pJV53::hyg	Hyg <sup>R</sup> , Hygromycin resistant derivative of Plasmid pJV53	V. Malaga
pGBT	Kan <sup>R</sup> , <i>C. glutamicum</i> <i>tetRO</i> promoter cloned in pGB9.2	[28]
pMVZ261	Zeo <sup>R</sup> , source of the <i>Sh ble</i> gene	G. Etienne
pC	Kan <sup>R</sup> , native copy of MSMEG_1342 cloned in pGBT	This work
pABC	Kan <sup>R</sup> , native copy of MSMEG_1340/1341/1342 in pGBT	This work
pAB	Kan <sup>R</sup> , native copy of MSMEG_1340/1341 cloned in pGBT	This work
pBC	Kan <sup>R</sup> , native copy of MSMEG_1341/1342 cloned in pGBT	This work
pB	Kan <sup>R</sup> , native copy of MSMEG_1341 cloned in pGBT	This work

doi:10.1371/journal.pone.0145883.t001

## Construction of deletion mutants

KO-mutants were generated with the recombineering system [27,28], with slight modifications [28]. To delete the whole *hadABC* cluster, co-transformation was done with 100 ng of plasmid DNA along with 100 ng of AES (allelic exchange sequence), and selection made on Zeocin, Kanamycin and Tetracycline containing medium. PCR on lysates of recovered clones were performed to check for the replacement of the target sequence by the Zeocin resistant cassette.

## Drugs and temperature susceptibility assays

Cultures at OD<sub>590</sub> ~4–5 of the different strains were adjusted to the same OD then serially diluted. 5 µl of each dilution (starting OD<sub>590</sub> 0.2) was spotted on 7H10-based medium containing OADC, glycerol, Tetracycline (20 ng/ml) and Kanamycin (37.5 µg/ml). When required, drugs were added to the medium: Rifampicin (2 µg/ml), Isoniazid (5 µg/ml), Ethionamid (10 µg/ml), Ethambutol (5 µg/ml) and Vancomycin (1 µg/ml). After 4–5 days at 37°C (for drugs testing) or at 30°C, 37°C and 42°C (for temperature testing), CFUs were counted.

## Susceptibility to SDS

Cultures were grown to OD<sub>590</sub> ~0.6–0.8 in 7H9 medium + ADC + glycerol + tween + Kanamycin + Tetracycline, harvested, washed once with 7H9 + tween, and suspended in an equal volume of 7H9 + glycerol + Kanamycin + Tetracycline + tween. Then, each preparation was adjusted to OD<sub>590</sub> 0.2 and SDS added to 0.1% final. After 65 min, aliquots were serially diluted and spotted on growth plates. Survival rate was estimated by counting the CFUs after incubation for 3–4 days at 37°C.

## Sedimentation assays

Cultures at OD<sub>590</sub> ~4–5 of the different strains in 7H9 + ADC + glycerol + tween + Kanamycin + Tetracycline, were adjusted in triplicate to OD<sub>590</sub> ~1 and kept unshaken at 37°C. At 3 and 22 hours, the upper 1 ml was removed for OD measurements.



## Biofilm formation

Exponential phase cultures ( $OD_{590} \sim 1$ ) in 7H9 medium + ADC + glycerol + tween + Kanamycin + Tetracycline, were diluted (1:100) in standard Sauton's media [29] containing Kanamycin and Tetracycline. Then 4.5 ml samples were dispensed into 12 wells plates (3 wells/strain). After being wrapped three times with parafilm, the plates were incubated at 37°C for one week.

## Nile Red accumulation

The experiment was performed as previously described with slight modification [30]. Strains were grown as a cell layer on solid 7H10 medium containing glycerol, ADC, Kanamycin and Tetracycline. Cells were scrapped and resuspended in PBS buffer (containing 25 mM glucose). Each suspension was adjusted to  $OD_{590}$  0.5, then Nile Red added (4  $\mu$ M final). Fluorescence at 610 nm (excitation at 533 nm) was measured in technical triplicate in a 96 wells plate (incubated at 37°C) with the Clariostar reader (BMG).

## Total RNAs preparation

Cultures were grown to  $OD_{590} \sim 0.6$ – $0.8$  in 7H9 medium + ADC + glycerol + tween + Kanamycin + Tetracycline. Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen) following manufacturer's instructions with slight modifications. Briefly, 15 ml of cultures were centrifuged for 5 min at 1,600 g, the pellet suspended in 1.2 ml of 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol containing RLT lysis buffer along with 0.1 mm-diameter glass beads. Cells were lysed by two 120 sec pulses at full speed in a bead-beater device. The sample was centrifuged 30 sec at 14,800 g. One volume of absolute ethanol was added to the filtrate, and total RNA purified with an RNeasy column following the manufacturer's procedure. RNA sample was treated twice for 45 min with successively 3U and 2U of Turbo DNase (Turbo DNA free kit-Ambion). Biological triplicates were performed for each condition.

## Analysis of Mycolic Acids. Cultures were grown to stationary phase in 7H9 medium + glycerol + Kanamycin + Tetracycline

Whole cells or bacterial residues obtained after lipid extraction with organic solvents [31] were saponified by a mixture of 40% KOH and methoxyethanol (1:7, v/v) at 110°C for 3 h in a screw-capped tube. After acidification, fatty acids were extracted with diethyl ether and methylated with an ethereal solution of diazomethane [32]. The mycolate patterns of the strains were determined by HPTLC (High Performance Thin-Layer Chromatography) on HPTLC Silica Gel 60 (Merck), using a mixture of petroleum ether/diethyl ether (9:1, v/v, five runs) as eluent. Revelation of lipid spots was performed by immersion of the plate in a solution of rhodamine. The various classes of mycolates,  $\alpha$ -,  $\alpha'$ -, epoxy-mycolates ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ , E, respectively) and the compound X were quantified by absorption measurement at the specific wavelength with TLC Scanner 3 using wincats software.

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) was performed in reflectron mode, using the 5800 MALDI-TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems/ABSciex) equipped with a Nd:YAG laser (349 nm wavelength). A total of 2,500 shots were accumulated in positive ion mode. Lipid samples were dissolved in chloroform and were directly spotted onto the target plate as 0.5  $\mu$ l droplets, followed by the addition of 0.5  $\mu$ l of matrix solution (10 mg of 2,5-dihydroxybenzoic acid [Sigma-Aldrich]/ml in  $CHCl_3/CH_3OH$ , 1/1 [vol/vol]). Samples were allowed to crystallize at room temperature. Mass spectrometry data were acquired using the instrument default calibration [33].

For Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analyses, compounds were dissolved in CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (1/1, v/v, 99.8% purity, Euriso-top, CEA Saclay, France). 1D and 2D <sup>1</sup>H- COSY 1H/1H (CORrelation Spectroscopy) experiments were conducted in the 600 MHz Bruker NMR spectrometer equipped with cryosonde. <sup>1</sup>H chemical shifts are given in parts/million downfield from internal tetramethylsilane at 0 ppm. All experiments were recorded at 295° K without sample spinning. The Bruker pulse programs were used and optimized (pulse lengths and delays) for each one- or two-dimensional experiments. Data were analyzed using the TopSpin (Bruker BioSpin) software.

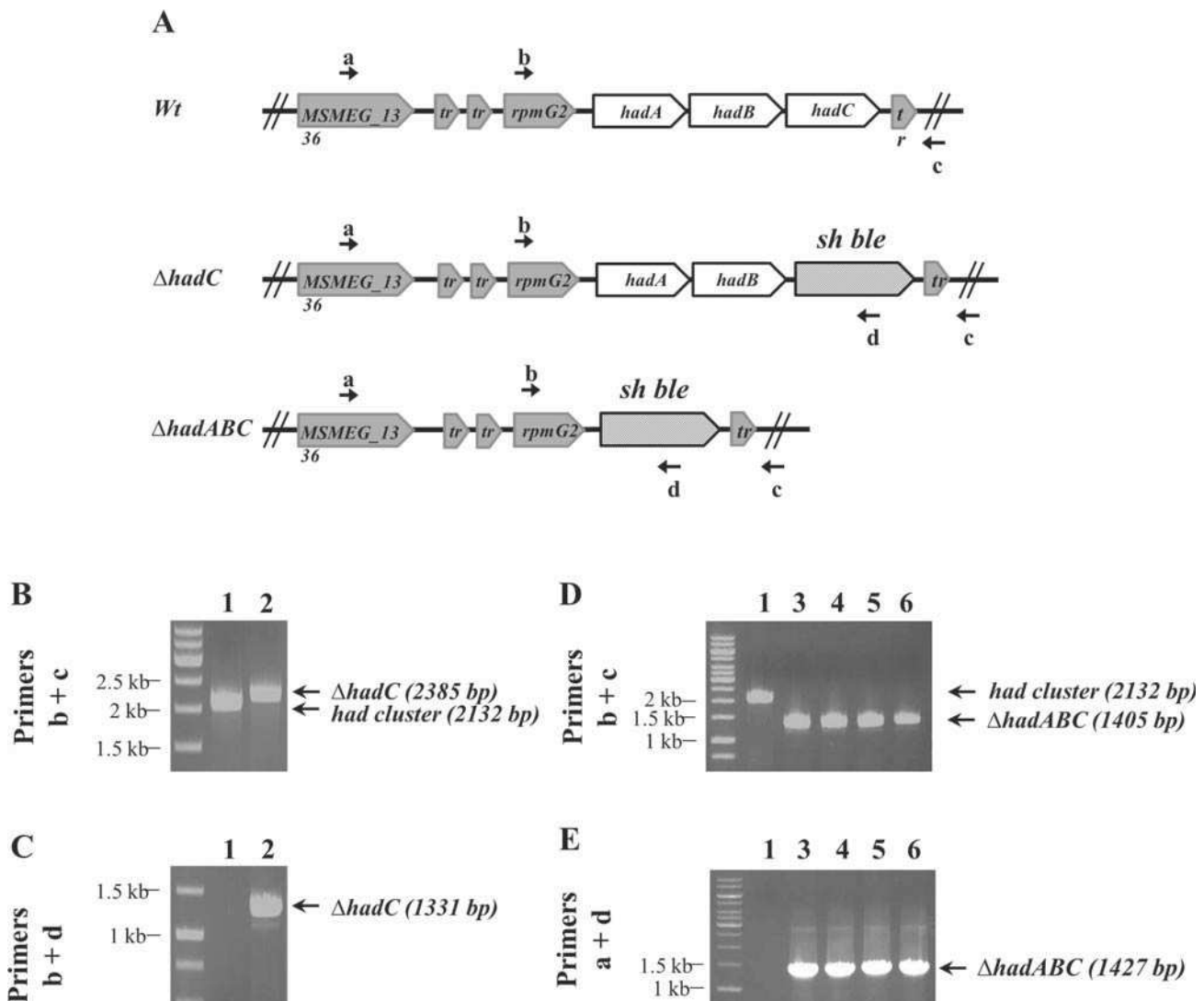
## Results

### The HadA and HadC subunits are dispensable to cell viability

In *M. tuberculosis*, the *hadA*, *hadB* and *hadC* genes may be co-transcribed from five promoters [28]. The synteny observed between *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* in this region suggests that the operon organization is also conserved in *M. smegmatis* [28]. Comprehensive transposon mutagenesis in *M. tuberculosis* has concluded that *hadC* is not essential [16,17]. Accordingly we were able to delete *hadC* in *M. smegmatis*, by replacing the gene by a zeocin resistance cassette (Fig 1A–1C). To get further insights into the contribution of each of the *hadA*, *hadB* and *hadC* genes to the bacterial physiology, we attempted to generate mutants bearing various deletion combinations of the three genes. To avoid any polar effect of inactivating genes organized into an operon, this was done by co-transforming the *wt* strain with an allelic exchange sequence fragment to delete the whole *hadABC* operon and a plasmid expressing different combinations of the *had* genes. The set of plasmids included pGBT, the cloning vector, and pABC, pBC, pAB, pB expressing from a *tetROp* promoter either the whole operon or *hadB* and *hadC* or *hadA* and *hadB* or only *hadB*, respectively. Each co-transformation was independently repeated at least twice and consistently gave reproducible results. As expected, no co-transformant was obtained with the vector alone (pGBT), *hadB* being essential [15], whereas complementing with the pABC plasmid gave 10–15 colonies. With the same efficiency, plasmid pAB ( $\Delta$ *hadC*) also gave co-transformants, in agreement with our ability to delete the chromosomal copy of the *hadC* gene. Interestingly, transformants were also obtained with plasmid pBC ( $\Delta$ *hadA*), indicating that *hadA* was not essential either in *M. smegmatis*. More surprisingly, a comparable co-transformation efficiency was observed with plasmid pB ( $\Delta$ *hadAC*), indicating that cells were viable despite the inactivation of both *hadA* and *hadC* (Fig 1). Therefore HadB was the only essential subunit of the HadA-HadB and HadB-HadC dehydratase complexes.

### Impact of HadC on the adaptive response to cold shock

As a first step to evaluate the contribution of each of the *had* genes to the fitness of the bacterium, the growth of the mutants was followed in 7H9-based liquid cultures. As shown in Fig 2A and 2B, the growth curves of the single ( $\Delta$ *hadC* and  $\Delta$ *hadA*, i.e.  $\Delta$ *hadABC*/pAB and  $\Delta$ *hadABC*/pBC, respectively) and double mutants ( $\Delta$ *hadAC* i.e.  $\Delta$ *hadABC*/pB) were comparable to that of the *wt* reference strains (*wt*/pGBT and  $\Delta$ *hadABC*/pABC), each strain reaching a similar plateau value with similar growth rates (Fig 2B). In contrast, when a cold-shock was applied, although a lag was observed for all strains before the growth resumed, the lag displayed by the  $\Delta$ *hadC* ( $\Delta$ *hadABC*/pAB) and  $\Delta$ *hadAC* ( $\Delta$ *hadABC*/pB) mutants lasted twenty hours longer (Fig 3). As the growth profile of the  $\Delta$ *hadA* ( $\Delta$ *hadABC*/pBC) was similar to that of the control *wt* strains, it was concluded that the longer lag phenotype of the  $\Delta$ *hadC* and  $\Delta$ *hadAC* strains was likely due to the inactivation of the *hadC* gene. Expectedly, the simple *hadC* deletion mutant ( $\Delta$ *hadC*/pGBT) displayed a growth profile similar to that of  $\Delta$ *hadABC*/pAB, a phenotype fully complemented by a plasmid expressing *hadC* ( $\Delta$ *hadC*/pC) (data not shown).



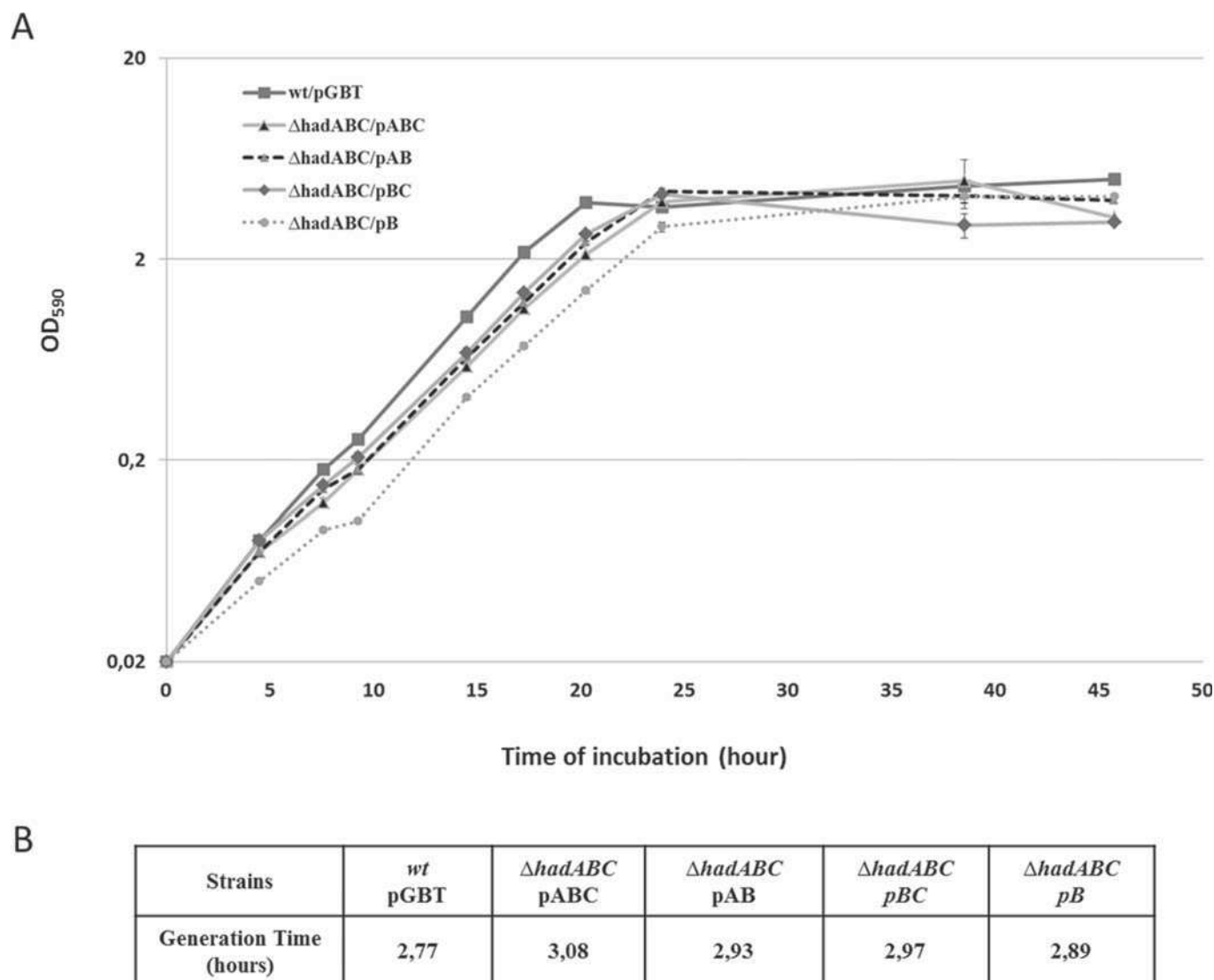
**Fig 1. Construction of *M. smegmatis*  $\Delta$ hadC and  $\Delta$ hadABC strains by recombineering.** (A) Genetic organization showing the replacement of the *hadC* gene and *hadABC* operon by a zeocin resistance cassette (*Sh ble*) and the primers a, b, c, d used for PCR verification of the constructions. (b+c) primer couple confirms the deletion of the *hadC* gene (B) and *hadABC* operon (D). Amplification with the (b+d) and (a+d) primer couples confirms the presence of the zeocin cassette in the *ΔhadC* (C) and *ΔhadABC* (E) strains, respectively. PCR was performed on cell lysates: *wt* (lane 1), *ΔhadC* (lane 2), *ΔhadABC* (lanes 3–6) carrying either the plasmid pABC (lane 3) or pAB (lane 4) or pBC (lane 5) or pB (lane 6).

doi:10.1371/journal.pone.0145883.g001

Therefore a functional HadC, although not essential, is required for the adaptive response of the bacterium to a cold-shock.

## Colony morphology and sedimentation velocity in the *hadA/hadC* mutants

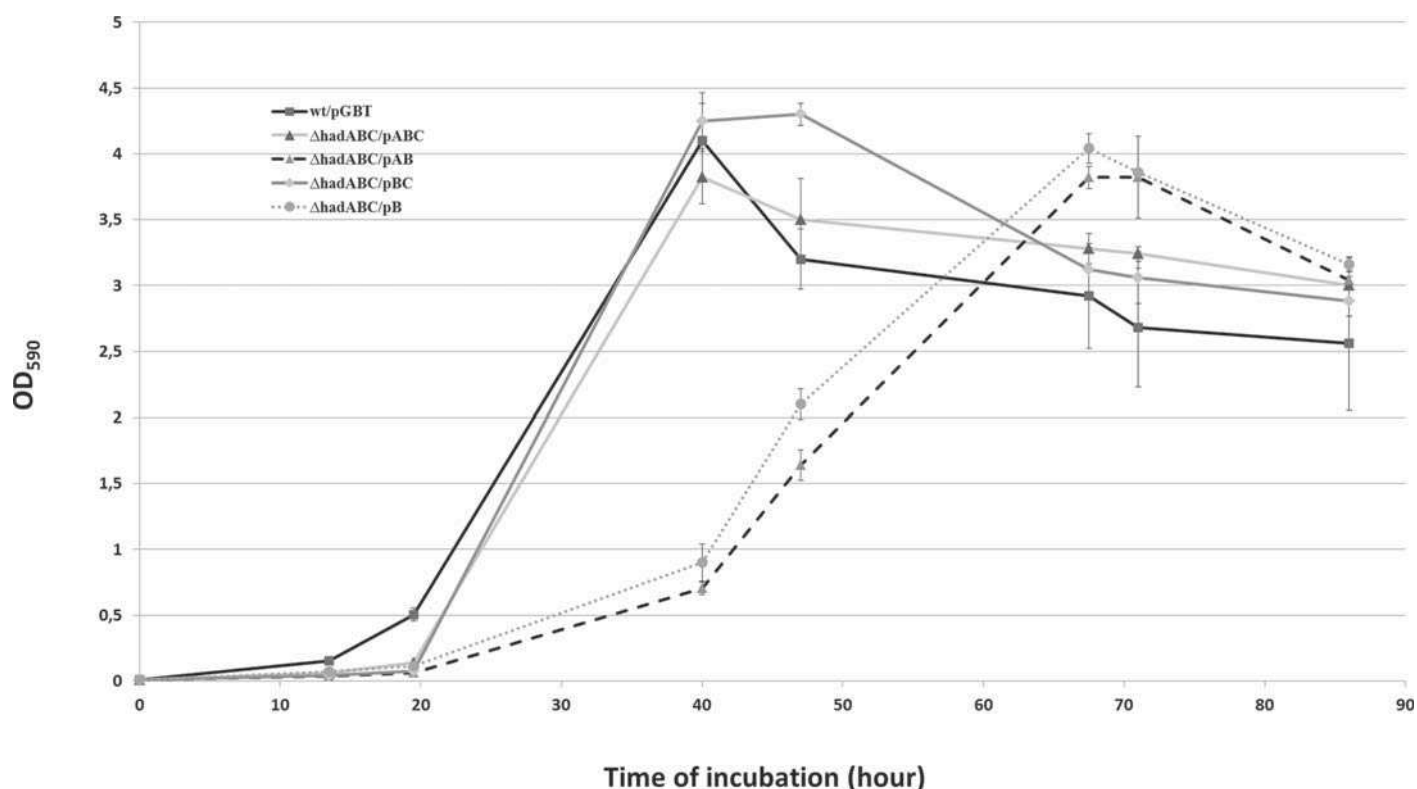
The colony morphology of some of the mutants was readily distinguishable from that of the *wt*, as illustrated in Fig 4. The *wt* strain (*wt*/pGBT) formed rough colonies with ridges and well-delimited borders whereas the *hadC* mutant (*ΔhadC*/pGBT) formed smooth colonies with unstructured border. The introduction of a plasmid expressing the wild-type *hadC* allele from a TetR-regulated promoter (pC) partially restored the wild-type morphology (*ΔhadC*/pC). In



**Fig 2. The inactivation of either *hadA*, or *hadC* or *hadAC* does not affect the growth of *M. smegmatis*.** (A) Growth curves at 37°C in 7H9-based medium. Error bars represent standard deviations from three biological replicates. (B) Calculated generation time for each strain during exponential growth.

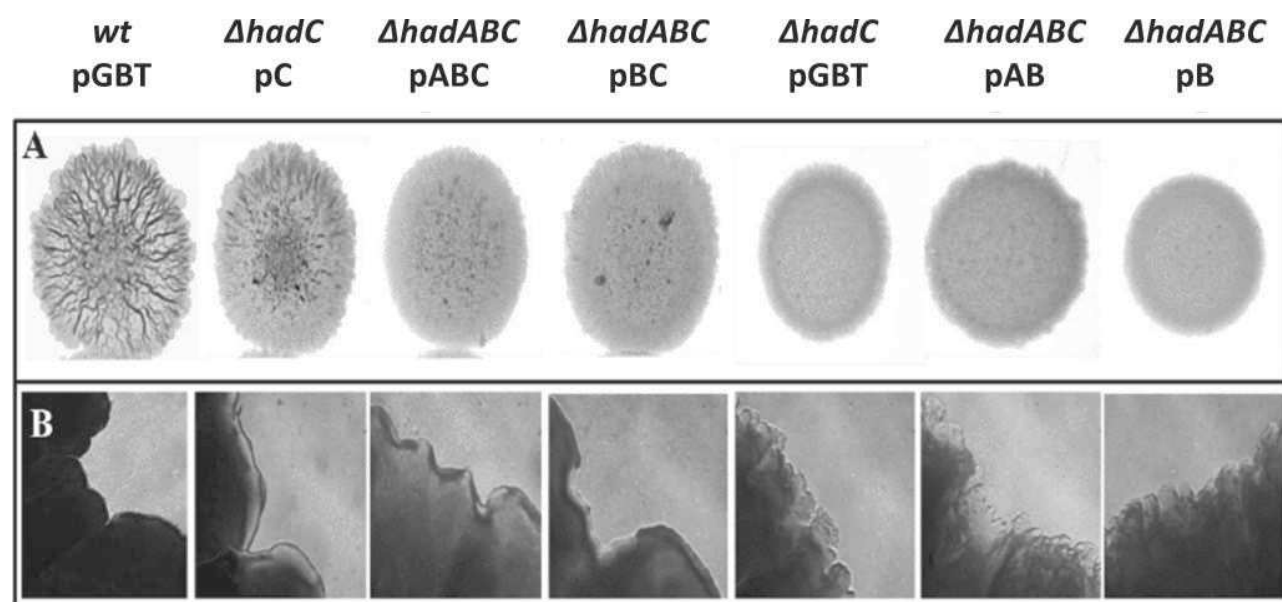
doi:10.1371/journal.pone.0145883.g002

the  $\Delta$ *hadABC* background, the expression of the *hadABC* genes from the *tetRO* promoter (pABC) led to the formation of rough colonies with well delimited border, although the roughness was less pronounced than that of the *wt* strain (Fig 4). The absence of a full complementation in both  $\Delta$ *hadC*/pC and  $\Delta$ *hadABC*/pABC strains was likely due to a lower expression of the *had* genes from the *tetRO* promoter as shown by RT-qPCR (S1 Fig). The morphology of the  $\Delta$ *hadABC*/pAB colonies ( $\Delta$ *hadC*) as well as that of the double mutant  $\Delta$ *hadABC*/pB ( $\Delta$ *hadAC*) was smoother with more unstructured border than that of the appropriate reference strain ( $\Delta$ *hadABC*/pABC). Considering that the morphology of the  $\Delta$ *hadABC*/pBC colony ( $\Delta$ *hadA*) was similar to that of the control  $\Delta$ *hadABC*/pABC strain, we concluded that the alteration of the colony morphology was mainly due to the inactivation of *hadC*. Smooth colony morphology might be indicative of the alteration of the cell surface proprieties. Because cell sedimentation velocity is inversely correlated to the hydrophobicity of the envelope [34], measuring the



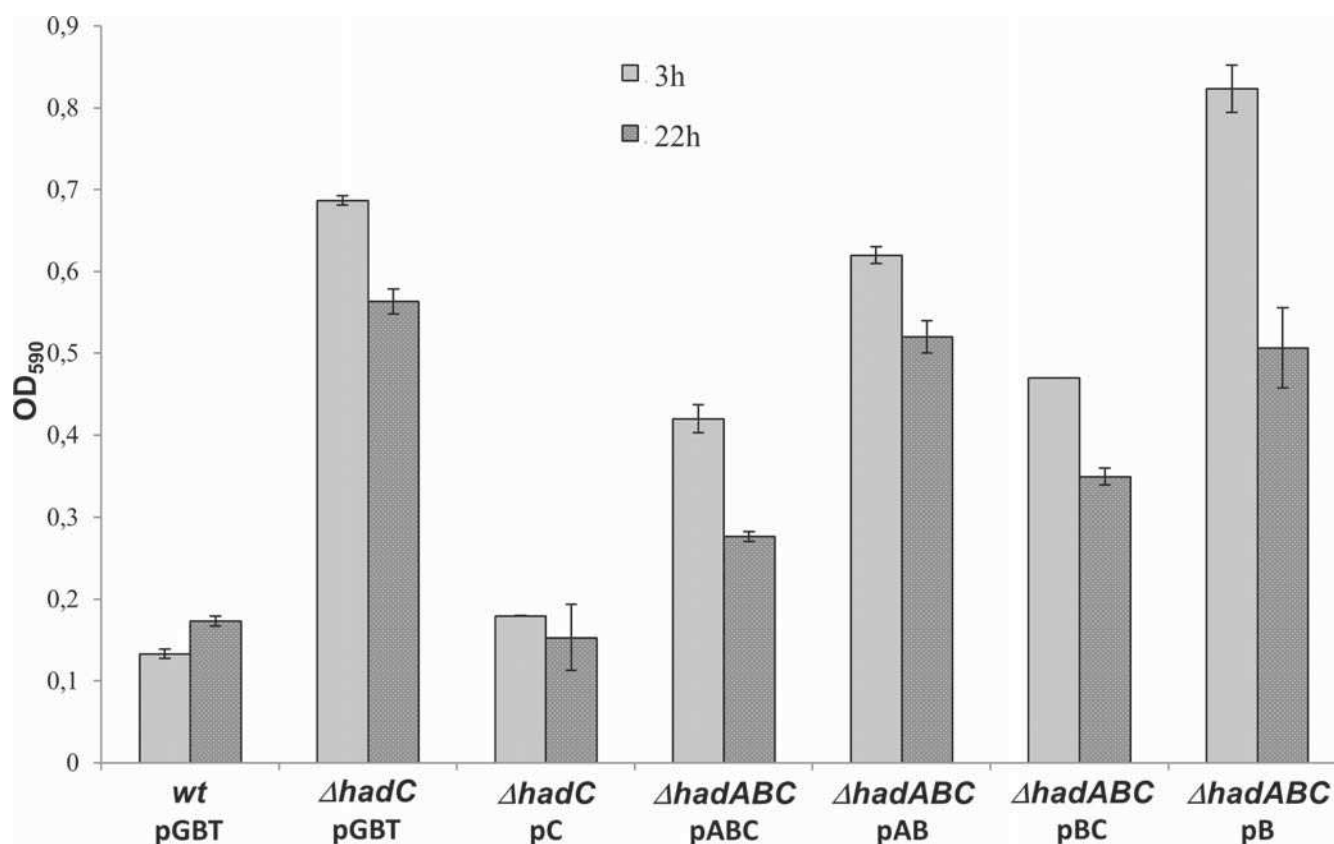
**Fig 3. *hadC* is required for the adaptive response to cold-shock.** Exponential phase cultures at 37°C were diluted 100-fold in 7H9-based medium kept at room temperature (and not in a 37°C pre-warmed medium as in Fig 2) then re-incubated at 37°C (time 0). Error bars represent standard deviations from three biological replicates.

doi:10.1371/journal.pone.0145883.g003



**Fig 4. The colony morphology of the *had* mutants is altered.** (A) Colony morphology of the various strains grown on 7H10-based medium. (B) Corresponding borders of the colony (10X-magnification), representative of five pictures taken at different locations.

doi:10.1371/journal.pone.0145883.g004



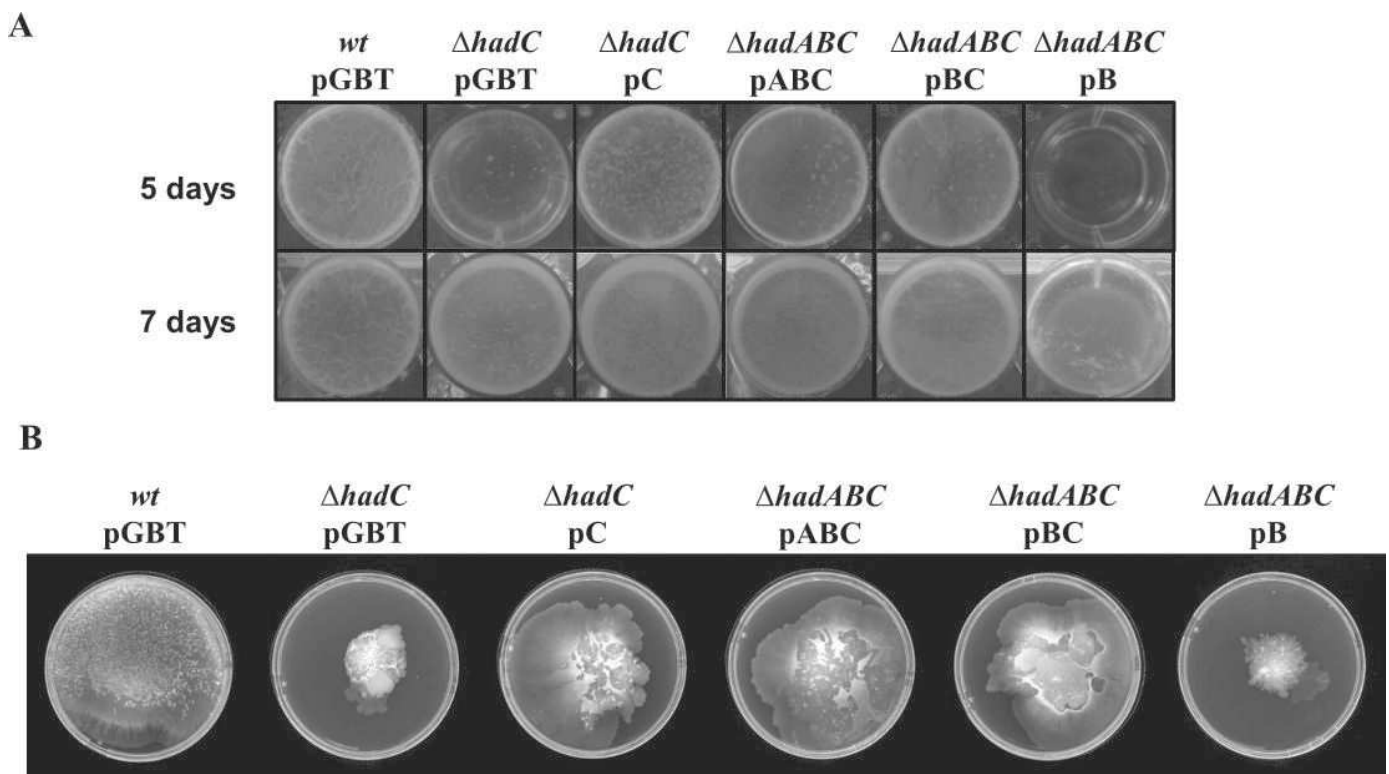
**Fig 5. The inactivation of *hadC* reduces the cell sedimentation rate.** Cultures at OD<sub>590</sub> ~ 4–5 were adjusted at OD<sub>590</sub> ~ 1 (in triplicate) in a 7H9 liquid medium containing Tween (0.05%) and Tetracycline (20 ng/ml) to induce the *tetR*Op promoter, then kept at 37°C without agitation. Sedimentation rates were estimated by measuring the OD of 1 ml sample taken from the upper most layers at 3 and 22 hours. Error bars represent standard deviations.

doi:10.1371/journal.pone.0145883.g005

rate of sedimentation could be a mean of underscoring the alteration of the envelope. When shacked cultures at OD<sub>590</sub> 1 were kept unshaken for 3 h and 24 h, the ODs of the upper layer of the cultures were 0.7 and 0.6 respectively for the *ΔhadC* mutant, whereas those for the *wt* cultures dropped to OD<sub>590</sub> ~0.15. The complementation of the mutant with the plasmid expressing *hadC* fully restored the *wt* phenotype (Fig 5). In the *ΔhadABC* background, similar results were obtained, *i.e.* the sedimentation velocity of the *ΔhadC* was slower (Fig 5, *ΔhadABC*/pAB). In agreement with the colony morphology phenotype, the sedimentation velocity of the *ΔhadA* mutant was similar to that of the *wt* strain (Fig 5, *ΔhadABC*/pBC), whereas that of the double *ΔhadAC* mutant (*ΔhadABC*/pB) was slower. Of note, the velocity of the double mutant was even slower than that of the single mutant *ΔhadC* at 3 h (*ΔhadABC*/pAB), indicating an additive effect of the *hadA* mutation on the phenotype of the *ΔhadC* strain. Therefore, altogether these results indicated that the HadC protein plays a major role in keeping the wild-type characteristics of the envelope, notably its hydrophobicity.

### The development of biofilms and the sliding motility are negatively affected by the inactivation of HadC

Lowering the hydrophobicity of the cell surface would negatively interfere with both the formation of biofilms and the sliding motility of *M. smegmatis* [35]. As shown on Fig 6A, the *hadC* mutation dramatically delayed the development of biofilms. At day 5 the *wt* (*wt*/pGBT,



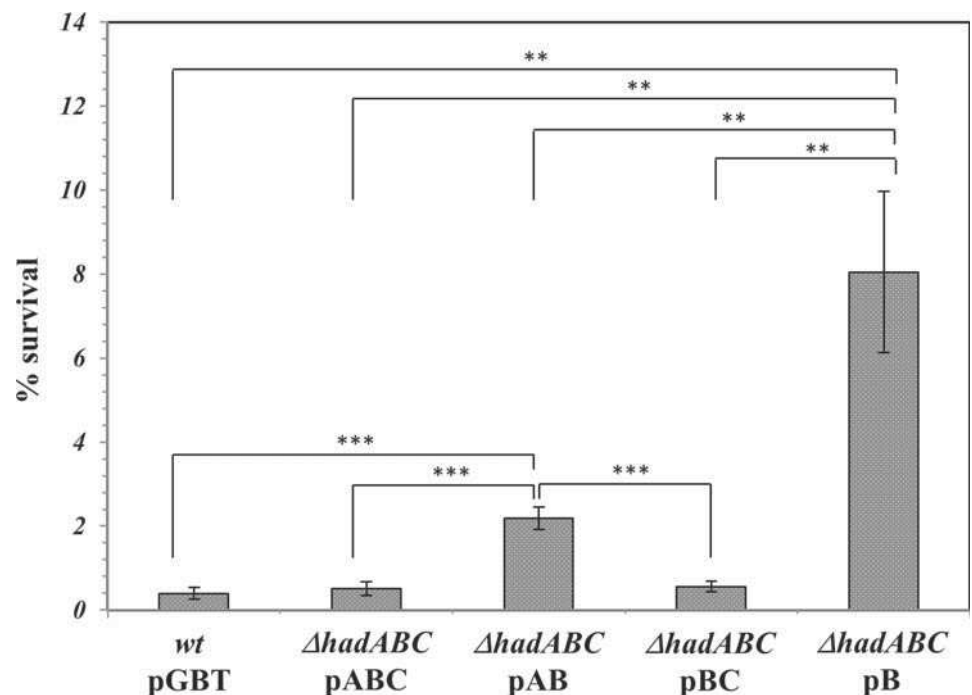
**Fig 6. The inactivation of *hadC* compromises the development of biofilms and the sliding motility.** (A) Biofilm formation was monitored after 5 and 7 days of growth. The picture is representative of 3 biological replicates. (B) The sliding motility was monitored after 7 days of incubation on a semi-solid 7H9 medium without any carbon source.

doi:10.1371/journal.pone.0145883.g006

$\Delta$ *hadABC*/pABC) as well as the  $\Delta$ *hadA* ( $\Delta$ *hadABC*/pBC) strains displayed a visible pellicle, in contrast to any of the  $\Delta$ *hadC* deletion bearing mutants ( $\Delta$ *hadC*/pGBT,  $\Delta$ *hadABC*/pAB and  $\Delta$ *hadABC*/pB strains). Complementation with a plasmid expressing *hadC* restored the wild-type rate of biofilms development ( $\Delta$ *hadC*/pC,  $\Delta$ *hadABC*/pBC). At day 7, biofilms could eventually be observed in the  $\Delta$ *hadC* mutants, but barely in the  $\Delta$ *hadABC* mutant ( $\Delta$ *hadABC*/pB), indicating that, the loss of a functional *HadA*, if it has no visible effect by itself, could again have an additive effect when combined with the inactivation of *hadC*. Fig 6B displays the results of the sliding motility assays. After seven days of incubation, the *wt* strain cells (*wt*/pGBT,  $\Delta$ *hadABC*/pABC) covered the whole surface of the Petri dish, whereas cells bearing a  $\Delta$ *hadC* deletion ( $\Delta$ *hadC*/pGBT and  $\Delta$ *hadABC*/pB strains) remained concentrated at the center of the Petri dish. Plasmids expressing *hadC* did restore a wild-type phenotype ( $\Delta$ *hadC*/pC,  $\Delta$ *hadABC*/pBC). Again the loss of a functional *HadA* ( $\Delta$ *hadABC*/pBC) has no visible effect by itself, but aggravates the  $\Delta$ *hadC* phenotype ( $\Delta$ *hadABC*/pB). These results therefore underscore the major role of the accessory gene *hadC* and strengthened the notion that *HadC* contributes to the hydrophobicity potential of the envelope.

### Resistance to SDS and permeability to the lipophilic Nile Red molecule

Alteration of the hydrophobicity of the envelope may be detected by measuring the sensitivity of bacteria to detergents [36,37]. The cell fraction surviving a 65-min challenge to 0.1% SDS was then measured (Fig 7). The survival rate of *wt* strains (*wt*/pGBT,  $\Delta$ *hadABC*/pABC), as well as that of the  $\Delta$ *hadA* strain ( $\Delta$ *hadABC*/pBC), was similar and closed to 0.4%. In contrast the



**Fig 7. The *hadC* and *hadAC* mutant strains are more resistant to SDS.** The survival rates were estimated by counting the CFUs (in duplicate). Error bars represent standard deviation from three biological replicates. P-values < 0.05 (\*), < 0.01 (\*\*), < 0.001 (\*\*\*).

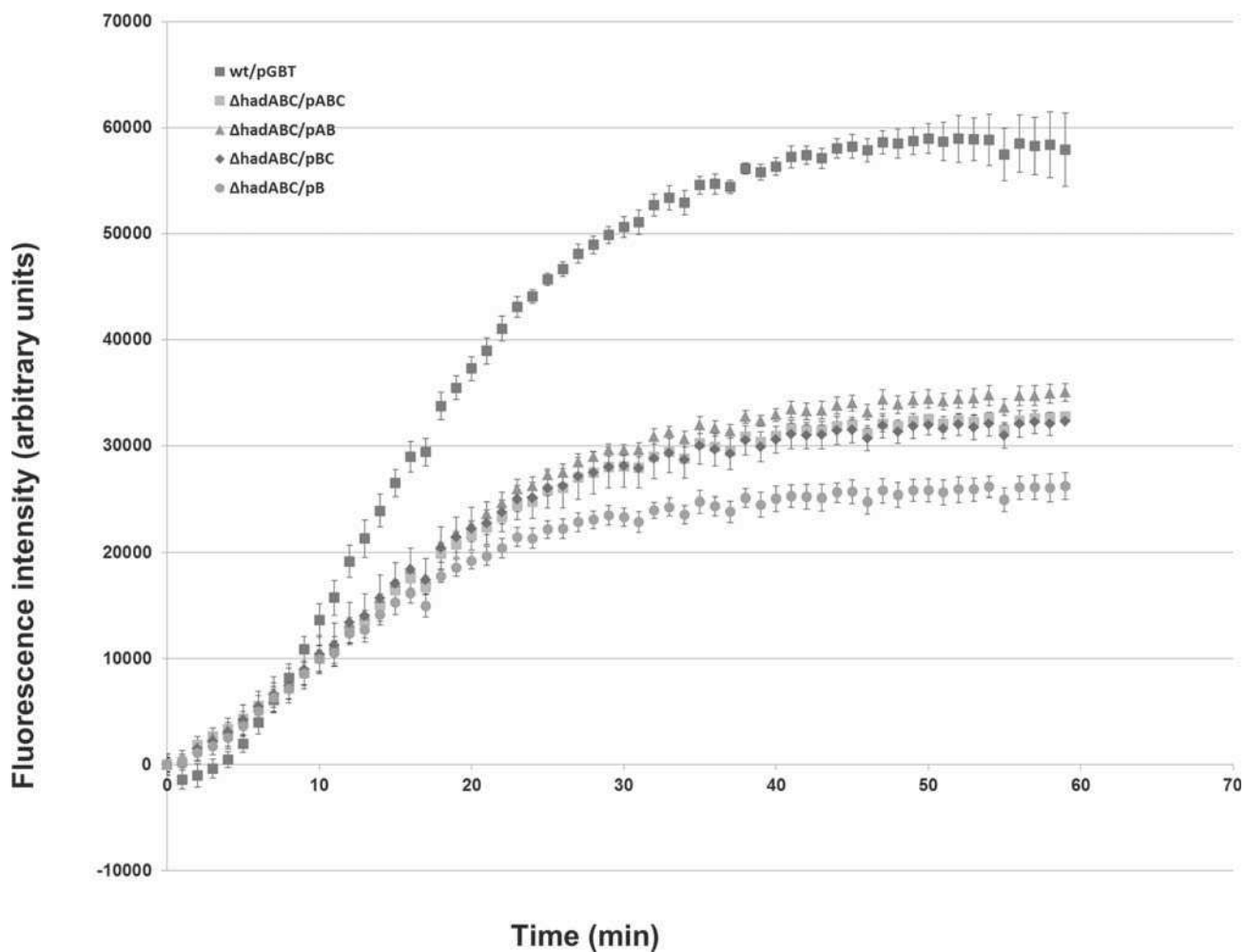
doi:10.1371/journal.pone.0145883.g007

deletion of *hadC* ( $\Delta hadABC/pAB$ ) rendered the bacteria 6-fold more resistant to SDS. When the deletion of *hadA* was combined to that of *hadC* ( $\Delta hadABC/pB$ ), the resistance of the bacteria was even higher, with a survival rate of 8%. These results are in agreement with a lowering of the hydrophobicity of the envelope associated with the inactivation of *hadC* and again confirmed the synergistic effect of the simultaneous loss of *hadA*. With the affected hydrophobicity of the  $\Delta hadC$  envelope, the mutant is expected to accumulate less the lipophilic molecule Nile Red [30]. Accordingly, although the *wt*-like reference strain ( $\Delta hadABC/pABC$ ) did accumulate the Nile Red molecule less efficiently than the real *wt* strain (*wt/pGBT*), the accumulation kinetics of the  $\Delta hadAC$  double mutant ( $\Delta hadABC/pB$ ) was much less efficient than those of the two former strains (Fig 8). Although with this assay the phenotype of the single mutants ( $\Delta hadABC/pBC$  or  $\Delta hadABC/pAB$ ) could not be distinguished from that of the control strain ( $\Delta hadABC/pABC$ ), the results reinforced the notion that HadA exacerbates the effect of HadC and that both proteins are required for maintaining the hydrophobic potential of the envelope.

### The fitness of the $\Delta hadC$ and $\Delta hadAC$ mutants is compromised at high temperature

Considering the importance of the thermal regulation of the fluidity of the biological membrane and the contribution of the MA structure to this fluidity in mycobacteria [38,39], we challenged the fitness of the *had* mutants at different temperatures. As shown in Fig 9, the efficiency of colony formation of the *hadC* mutants ( $\Delta hadC/pGBT$ ,  $\Delta hadABC/pAB$ ) was similar to that of the appropriate *wt* reference strains (*wt/pGBT*,  $\Delta hadABC/pABC$ ) at 30°C and 37°C, but was three orders of magnitude lower at 42°C. The temperature sensitivity of the mutant was fully complemented by the *hadC*-expressing plasmid ( $\Delta hadABC/pABC$ ). A functional HadC is





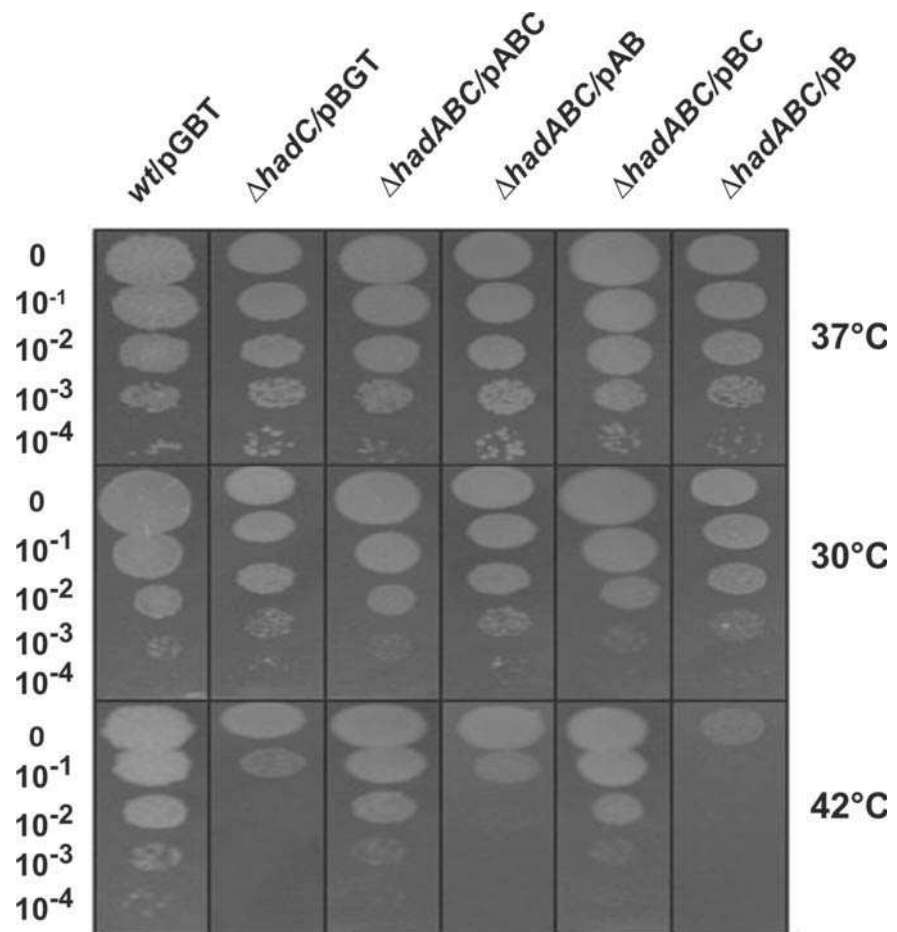
**Fig 8. The *hadAC* double mutant envelope is more permissive to the lipophilic Nile Red.** This is a representative experiment of two biological repeats giving similar results. Data and error bars from technical triplicate represent the means and standard deviation, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0145883.g008

therefore required for optimal growth at high temperature. In contrast the fitness of the *hadA* mutant ( $\Delta hadABC/pBC$ ) was not compromised at 42°C. Moreover, when the *hadA* mutation was combined with the *hadC* deletion ( $\Delta hadABC/pB$ ), the sensitivity of the double mutant to high temperature was one order of magnitude even higher than that of the single *hadC* mutation ( $\Delta hadC/pGBT$ ,  $\Delta hadABC/pAB$ ). Again a phenotype associated to the inactivation of *hadA* was only visible in a  $\Delta hadC$  background.

### Sensitivity of the $\Delta hadC$ mutant to selective drugs

The very low permeability of the envelope is a hallmark of mycobacteria [40]. This characteristic contributes to the resistance of mycobacteria to a wide range of antibiotics [41]. As MAs, the major constituent of the mycomembrane, play an essential role to this barrier [42], we measured the susceptibility of the *had* mutant to various drugs. The results are shown in Table 2. The efficiency of colony formation of the *hadC* mutant ( $\Delta hadC/pGBT$ ) towards Rifampicin (RIF), a large lipophilic anti tubercular drug targeting the transcription apparatus was at least three orders of magnitude below that of the *wt* strain (*wt/pGBT*). This susceptibility phenotype



**Fig 9. The fitness of the *hadC* and *hadAC* mutants is compromised at high temperature.** CFUs were recorded at day 4 for the 37°C and 42°C plates and at day 5 for the 30°C plates.

doi:10.1371/journal.pone.0145883.g009

was fully complemented by the *hadC* expressing plasmid pC ( $\Delta hadC/pC$ ). The loss of HadaA neither impaired the susceptibility of the strain ( $\Delta hadABC/pBC$ ) nor exacerbated the susceptibility of a *hadC* mutant ( $\Delta hadABC/pB$ ) to RIF. The  $\Delta hadC$  mutant ( $\Delta hadC/pGBT$ ) was also two orders of magnitude more susceptible to Isoniazid (INH) and Ethionamid (ETH), a first- and a second-line anti tubercular small hydrophilic drugs, respectively, both targeting the FAS-II InhA enzyme [43]. The pC complementing plasmid fully restored the wild-type susceptibility level ( $\Delta hadC/pC$ ). Again the loss of a functional HadaA was neutral, in both the single ( $\Delta hadABC/pBC$ ) and in the double mutants ( $\Delta hadABC/pB$ ). Importantly, when challenged

**Table 2. Drug hyper-susceptibility of the *had* mutants.** CFUs were recorded at day 4 of incubation at 37°C. Relative values to *wt*'s are shown.

Drug ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>wt/pGBT</i>	$\Delta hadC/pGBT$	$\Delta hadC/pC$	$\Delta hadABC/pABC$	$\Delta hadABC/pBC$	$\Delta hadABC/pB$
Ethambutol (5)	1	1	1	1	1	1
Isoniazid (5)	1	$10^{-2}$	1	1	1	$10^{-2}$
Ethionamid (10)	1	$10^{-2}$	1	1	1	$10^{-2}$
Rifampicin (2)	1	$< 10^{-3}$	1	1	1	$< 10^{-3}$
Vancomycin (1)	1	$10^{-2}$	1	1	1	$10^{-4}$

doi:10.1371/journal.pone.0145883.t002

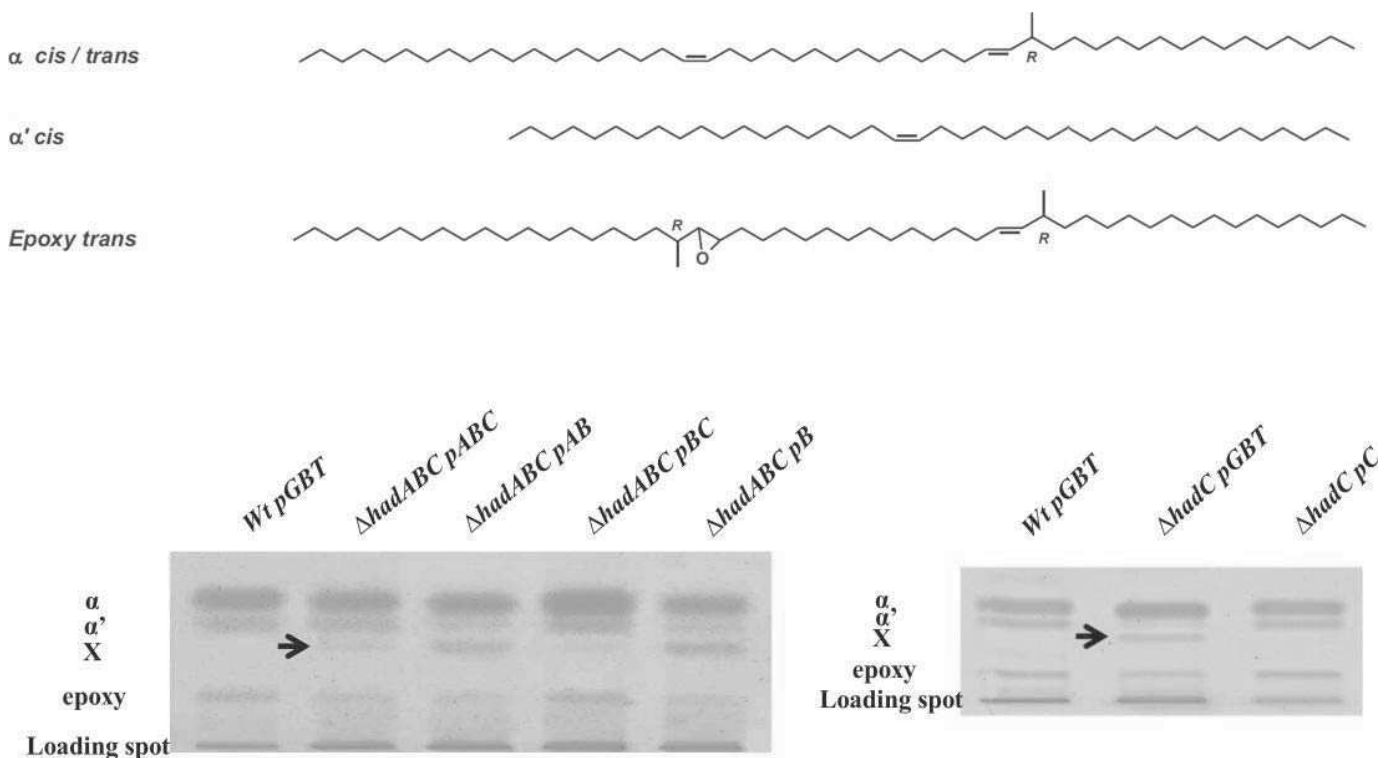
against Ethambutol (EMB), another small hydrophilic drug that targets the arabinogalactan biosynthesis machinery [44], no effect of the various mutations was observed. The susceptibility of the mutants was also tested against Vancomycin (VAN), a drug that cannot diffuse across outer membranes, including the mycomembrane [45], due to its size (1450 Da) and its hydrophilicity. Interestingly, the *hadC* mutant was more susceptible to VAN by two orders of magnitude than was the *wt* and the complemented *hadC*/pC strains. This result therefore suggested a dramatic lowering of the hydrophobicity of the mycomembrane. Again the *hadA* mutation alone ( $\Delta hadABC$ /pBC) had no visible effect on the susceptibility to VAN. However when the mutation was combined with the *hadC* deletion ( $\Delta hadABC$ /pBC) the efficiency of plating decreased further down by two orders of magnitude when compared to that of the  $\Delta hadC$  strain.

### Mycolic acids profile of the *hadC* mutants

Mycolic acids (MAs) are 2-alkyl, 3-hydroxyl fatty acids, composed of a so-called meromycolic chain synthesized by the FAS-II complex, which is condensed with a shorter fatty acid chain that generates the so-called  $\alpha$ -branch synthesized by FAS-I. Each mycobacterium species is defined by specific types of meromycolic chains depending on the length of the chain and the types of decorations that are carried by the chains. In order to evaluate the impact of the mutations of the *had* genes on the MA structures, lipids were extracted from the different mutants and analyzed. Similar amounts of lipids were extracted from the strains (roughly 17% of the dry weight). Saponification of the bacterial residues, followed by extraction and methylation of MAs yielded comparable amounts of lipid material (8–9% of the delipidated cell walls), which were quantitatively analyzed by high-performance thin layer chromatography (HPTLC). The *M. smegmatis* *wt* displayed the expected  $\alpha$ -,  $\alpha'$ -, and epoxy-MAs (Fig 10) [31]. In the  $\Delta hadABC$  background, the complemented  $\Delta hadABC$ /pABC as well as the  $\Delta hadA$  ( $\Delta hadABC$ /pBC) strains displayed a profile similar to that of the *wt* (*wt*/pGBT), with traces of an additional spot (named X on Fig 10). These data are in agreement with the phenotypes described above, viz (i) that the pABC plasmid did not fully complement the  $\Delta hadABC$  deletion and (ii) that the single inactivation of HadA had no obvious impact on the bacterial physiology. In contrast, the deletion of *hadC*, both in the  $\Delta hadC$  ( $\Delta hadABC$ /pAB) and  $\Delta hadAC$  ( $\Delta hadABC$ /pB) mutants, clearly altered the HPTLC profile, with a decrease of the amount of epoxy-MAs and a concomitant increase of compound X. A similar altered profile was observed for the simple  $\Delta hadC$  mutant ( $\Delta hadC$ /pGBT) that was complemented by the pC plasmid ( $\Delta hadC$ /pC) (Fig 10).

As shown in Table 3, the relative amount of  $\alpha$ -,  $\alpha'$ - and epoxy-MAs in the *wt* strain was 63%, 23% and 14%, respectively. In the  $\Delta hadC$  mutant, whereas the sum of  $\alpha$ - and  $\alpha'$ -MAs (hardly separated by HPTLC) remained similar to that in the *wt* strain (84%), the relative amount of epoxy-MAs decreased to 5% with a concomitant emergence of the compound X representing 11% of the total. Complementing with the plasmid pC ( $\Delta hadC$ /pC) has kept the relative amounts of the  $\alpha$ - and  $\alpha'$ -MAs close to the *wt* values and has partially restored percentage of epoxy-MAs (9%) concomitantly to a decrease of compound X (4%).

MALDI-TOF MS comparative analyses indicated that the mass spectra of  $\alpha$ -,  $\alpha'$ - and epoxy-MAs from the *wt* and  $\Delta hadC$  mutants displayed similar signals with some differences in the odd/even ratios (data not shown), that may reflect a disruption in the protein-protein interactions between the dehydratases of FAS-II and methyltransferases that introduce unsaturations (double bonds, cyclopropanes) in MAs [28], as recently proposed for *M. tuberculosis*  $\Delta hadC$  mutant [18]. As shown in Fig 11, the mass spectrum of the purified compound X showed  $[M+Na]^+$  ion-peaks in the mass region of  $\alpha'$ -MAs, at *m/z* 907.8 (C59:2), 933.8



**Fig 10. The inactivation of HadC alters the MA profile.** (Top) Structures of the major species of the meromycolic chains in *M. smegmatis*.  $\alpha$ ,  $\alpha'$  and epoxy refer to the types of mycolic acids produced by the wt strain. *cis* and *trans* correspond to the configurations of the double bonds. R refers to the absolute configuration of the asymmetric carbon bearing the methyl branch. (Bottom) High-performance thin layer chromatography (HPTLC) of total fatty acid methyl esters derived from the saponification of crude cells from the wt, isogenic mutant and complemented strains.

doi:10.1371/journal.pone.0145883.g010

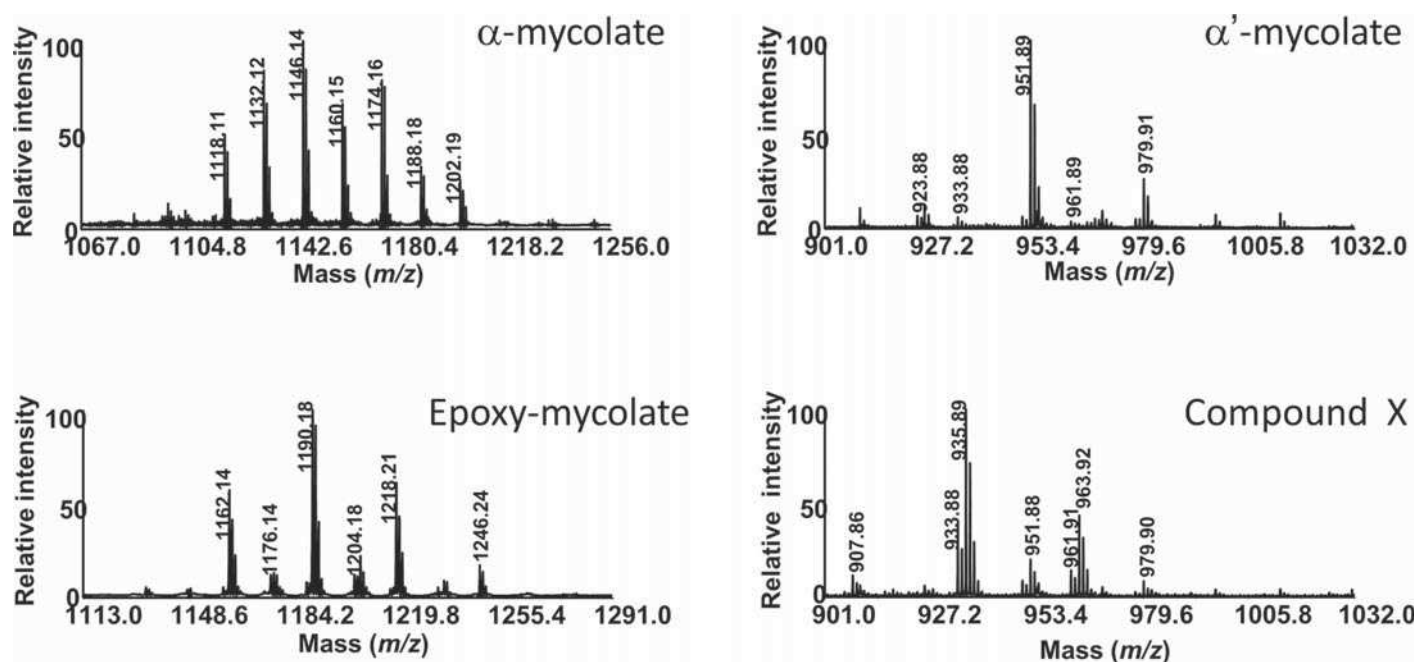
(C61:3), 935.8 (C61:2), 951.8 (C62:1), 961.9 (C63:3), 963.9 (C63:2). NMR analyses indicated similar structures, with the expected resonances [31] for the  $\alpha$ -,  $\alpha'$ - and epoxy-MAs, whereas the NMR spectrum of compound X did not exhibit the characteristic O-methyl signal from the ester group (at 3.7 ppm), and those at 2.4 and 3.6 ppm, assignable to the proton resonances at C-2 and C-3 positions in MAs, respectively (data not shown). These data therefore indicated the absence of a “mycolic motif” in compound X found chemically highly unstable. Nevertheless, the decrease of the amount of epoxy-MAs observed for the  $\Delta$ hadC mutant ( $\Delta$ hadC/pGBT), which was partially complemented by the pC plasmid ( $\Delta$ hadC/pC), and which was correlated with a concomitant increase of compound X (Fig 10, Table 3) suggests a biosynthetic relationship between the two compounds.

**Table 3. Inverse quantitative relationship between the epoxy-MAs and compound X.** Lipids were quantitated by high-performance thin layer chromatography (HPTLC). Values are average percentages of technical quadruplicates of total extractable lipids  $\pm \sigma$ ; nd = not detected.

	$\alpha$	$\alpha'$	epoxy	X
wt	63.14 $\pm$ 1.89	22.50 $\pm$ 1.47	14.36 $\pm$ 0.79	nd
$\Delta$ hadC		84.09 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	4.94 $\pm$ 0.74	11.02 $\pm$ 0.83
$\Delta$ hadC/pC	68.44 $\pm$ 2.08	19.27 $\pm$ 1.09	8.57 $\pm$ 0.91	3.73 $\pm$ 0.52

<sup>a</sup> Additive percentage of both  $\alpha$ - and  $\alpha'$ -mycolates;  $\alpha$ ,  $\alpha'$ , epoxy and X as in Fig 10.

doi:10.1371/journal.pone.0145883.t003



**Fig 11. MALDI-TOF mass spectra of the purified compound X,  $\alpha$ -,  $\alpha'$ - and epoxy-mycolates of *M. smegmatis*  $\Delta$ hadC mutant.** Values indicate the masses of sodium adducts ( $M+23$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0145883.g011

## Discussion

Mycolic acids (MAs), the major components of the mycomembrane, are essential for the viability and/or virulence of pathogenic mycobacteria [13,46]. The essential dehydration step in the biosynthesis of MAs is performed by the HadA-HadB and HadB-HadC complexes [14,15]. The HadB subunit bears the catalytic domain whereas HadA and HadC determine the substrate specificity [14,47]. In this work we showed, that in *M. smegmatis*, the inactivation of *hadC* and *hadA*, both separately and together, was compatible with cell viability. Therefore, either *in vivo* HadB, as a homodimer, could perform the essential dehydration step for the biosynthesis of mycolates or there may be protein(s) that would possess(es) function redundant to those of HadA and/or HadC. The later explanation is supported by phylogenetic studies indicating that Rv0504c (in *M. tuberculosis*) and MSMEG\_0948 (in *M. smegmatis*) are paralogs of HadA and HadC ([28], our unpublished data). Interestingly, a gene encoding a functional HadAB-like complex (MSMEG\_6754) has been recently identified in *M. smegmatis*, whose overexpression suppresses the lethality of a *hadB* mutation [48]. We have measured the expression of both MSMEG\_0948 and MSMEG\_6754 in the mutant backgrounds (S1 Fig). Although both genes were actually found down-regulated, one cannot exclude that this level of expression was sufficient to compensate for the loss of HadA and HadC.

Although not essential, the inactivation of *hadC* dramatically impacts the physiology and fitness of the bacterium. The inactivation of *hadA* alone has generally little or no impact in the tested conditions but when combined with the *hadC* deletion, the deletion of *hadA* could exacerbate the phenotype of the *hadC* mutant. The effects were both unspecific and specific. One of the unspecific effects caused by the absence of HadC is the lowering of the hydrophobicity of the cell. Accordingly mutant cells did not aggregate as much as wt cells and did give a smooth colony morphotype, both characteristics usually correlate with an avirulent phenotype in pathogenic mycobacteria species [49,50,51,52]. Similarly, the ability of the *hadC* mutant cells to

slide on the surface of growth medium [53] was also impaired, likely because the more hydrophilic envelope of the mutant would interact more with the substratum, preventing the sliding [35]. Similarly, the ability of the *hadC* mutant to develop biofilms was also affected, probably due to the reduced capacity of bacteria cells to aggregate. Although the biological role of biofilms for the pathogenicity in mycobacteria is still an issue [54,55,56], there is a correlation between the structure of MAs, the ability of forming biofilms and the virulence potential [57,58]. Accordingly in *M. tuberculosis* H37Rv genetic background we recently observed [18] that the virulence of a *hadC* mutant was compromised as that of the avirulent *M. tuberculosis* H37Ra strain that naturally bears a frameshift mutation inactivating the *hadC* [59].

Thermal regulation of the fluidity of biological membranes allows optimal membrane function at different temperatures. This can be done by changing the relative amount and structures of various lipids [39]. Indeed there are several reports showing that MAs structures are regulated by temperature with the ratio of saturation/unsaturation and the relative presence of functional groups in the MAs as well as the chain lengths of MAs being critical determinants of the fluidity of the mycomembrane [38,60,61,62,63]. Our data indicated a change in the sensitivity of the *hadC* and *hadAC* mutants to either cold- or high-temperatures. Expectedly, the MA profile of the *hadC* mutant was clearly altered, with notably the reduction of the synthesis of epoxy-MAs and the concomitant emergence of an unstable molecule (compound X), suggesting a possible biosynthetic filiation between the two compounds. Consistent with our findings, both HadC and HadA subunits have proved to be essential for the solubility and the stability of the HadB-containing enzymes in mycobacteria in vivo [14]. Furthermore, there are evidences for a functional interdependence between methyltransferases involved in the addition of functional groups and that of HadAB/HadBC enzymes [19,28,64,65]. Therefore, in the absence of HadC and HadA subunits, structural modifications that might be crucial to adapt to stresses, such as temperature changes, would no longer be introduced. Alternatively or additionally, as physical interactions between the proteins of the FAS-II system have been reported [65,66], the absence of HadC and HadA subunits might affect the stability of the whole biosynthesis complex in such a way that the synthesis of MAs would be compromised at high temperature.

The alteration of the permeability barrier in the *hadA* and *hadC* mutants was expected to impact the susceptibility of the bacteria to exogenous toxic compounds. Indeed the *hadC* mutant was more susceptible to Isoniazid (INH), Ethionamid (ETH) and Rifampicin (RIF) three anti-tubercular drugs currently used, and to Vancomycin (VAN). The susceptibility of the *hadC* mutant to RIF and VAN was exacerbated by a simultaneous deletion of *hadA*. In contrast, the susceptibility of the mutants to the anti-tubercular drug Ethambutol (EMB) was not changed. VAN is a large hydrophilic molecule that cannot diffuse through the lipophilic outer membrane lipid bilayer and as such cannot be used against gram negative pathogens. The higher susceptibility of the *hadC* and *hadAC* mutants to VAN was likely due to the lower hydrophobicity of their mycomembrane, allowing a better diffusion of the drug to reach its target, the growing peptidoglycan layer [67]. The higher susceptibility to RIF, a large hydrophobic molecule, might be explained by a higher fluidity of the mycomembrane in the mutants, permitting a better global diffusion of the drug [42,68]. Indeed, the inactivation of the *hadC* gene in *M. tuberculosis* results in the production of shorter MAs with higher unsaturation degree, two characteristics promoting an increased fluidity of the mycomembrane [18]. Interestingly, although EMB, INH and ETH are all small hydrophilic molecules, the *hadC* mutant was more susceptible to INH and ETH only. As this type of molecules likely diffuses through porins [42,69,70], the efficiency of their penetration into the cell would be less sensitive to the variation of hydrophobicity of the mycomembrane. Therefore the differential response of the mutant regarding the three drugs is probably more related to their modes of action. EMB targets the arabinogalactan biosynthesis pathway [44] whereas INH and ETH target InhA, an

enzyme of the FAS-II complex [43]. The absence of HadC might affect the overall structure of the FAS-II complex allowing a better accessibility of InhA to the drugs.

The low fitness as well as the higher susceptibility to drugs of the *hadC* and *hadAC* mutants suggest that targeting HadC and HadA could make the bacterium more susceptible to the natural host defenses and potentiate the activity of current anti-tubercular drugs. The outcome would be the possibility of reducing the drug dosage, limiting therefore the toxic side-effects as well as a shortening of the treatment. *In fine* that should improve the poor compliance with medical treatments, the main reason for the occurrence of resistant strains [8,71]. Actually, Thioacetazone and Isoxyl drugs both target HadAB enzyme and possibly HadBC [64,72,73]. They were both used as anti-tubercular agents but barely now because of a low efficacy (for Isoxyl [20] or toxic side-effects (for Thioacetazone [21]). However, more efficient and less toxic derivatives of both drugs have been reported [72,74,75]. In addition using the *hadC* and/or *hadAC* mutant(s) instead of the *wt* strain in an exhaustive drug screening might lead to the discovery of not only new anti-tubercular drugs but also to drugs already used against other pathogens that might also be now efficient against *M. tuberculosis*. Such a strategy based on the targeting of non-essential genes to weaken bacteria might be applied to any pathogens, as well.

## Supporting Information

**S1 Fig. Relative expression of the *hadA*, *hadB*, *hadC*, *MSMEG\_0948* and *MSMEG\_6754* genes in the mutant strains.** Error bars are SEM from three biological triplicates. The expression (log2) in the different mutants was relative to the *wt* strain values (*wt*/pGBT) and measured by RT-qPCR. For each sample, 1 µg of RNA was reverse transcribed using random hexamers and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. qPCR on purified cDNA was performed using KAPA SYBRFAST qPCR Master Mix universal (CliniSciences) and appropriate primer sets (S1 Table). qPCR in technical duplicate was performed in a Bio-Rad CFX96 thermocycler with the following protocol: denaturation at 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 3 s and annealing/elongation with data collection at 60°C for 20 s. Standard curves and melting curves were drawn to check for the amplification efficiency and the specificity of each primer pairs, respectively. The mean threshold cycle (CT) value was normalized against *sigA* CT. The fold difference of expression was calculated using the Pfaffl method (Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research 29: e45). (TIF)

**S1 Table. List of the RT-qPCR primers.**  
(DOCX)

## Acknowledgments

We are grateful to Graham F. Hatfull for providing the mycobacteria Recombineering system, Marcus A. Horwitz for the pGB9.2 plasmid, Brian D. Robertson for the pMIND plasmid and Wladimir Malaga for the pJV53::hyg plasmid. We thank the members of the Daffé's team for their constructive criticisms.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KC. Performed the experiments: SJ NS JD FL PT AL. Analyzed the data: KC NE AQ AP MD. Wrote the paper: KC.

## References

1. WHO (2014) Global tuberculosis report 2013. World Health Organization.
2. Balaban NQ, Gerdes K, Lewis K, McKinney JD (2013) A problem of persistence: still more questions than answers? *Nat Rev Microbiol* 11: 587–591. PMID: [24020075](#)
3. Gengenbacher M, Kaufmann SH (2012) *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev* 36: 514–532. doi: [10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x](#) PMID: [22320122](#)
4. Young DB, Gideon HP, Wilkinson RJ (2009) Eliminating latent tuberculosis. *Trends Microbiol* 17: 183–188. doi: [10.1016/j.tim.2009.02.005](#) PMID: [19375916](#)
5. Falzon D, Jaramillo E, Wares F, Zignol M, Floyd K, Raviglione MC (2013) Universal access to care for multidrug-resistant tuberculosis: an analysis of surveillance data. *Lancet Infect Dis* 13: 690–697. doi: [10.1016/S1473-3099\(13\)70130-0](#) PMID: [23743044](#)
6. Migliori GB, Sotgiu G, Gandhi NR, Falzon D, DeRiemer K, Centis R, et al. (2013) Drug resistance beyond extensively drug-resistant tuberculosis: individual patient data meta-analysis. *Eur Respir J* 42: 169–179. doi: [10.1183/09031936.00136312](#) PMID: [23060633](#)
7. Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, Ziazarifi AH, et al. (2009) Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. *Chest* 136: 420–425. doi: [10.1378/chest.08-2427](#) PMID: [19349380](#)
8. D.A. M (1998) How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. *INT J TUBERC LUNG DIS* 2: 10–15. PMID: [9562106](#)
9. Fattorini L, Piccaro G, Mustazzolu A, Giannoni F (2013) Targeting dormant bacilli to fight tuberculosis. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 5: e2013072. doi: [10.4084/MJHID.2013.072](#) PMID: [24363887](#)
10. Willand N, Dirie B, Carette X, Bifani P, Singhal A, Desroses M, et al. (2009) Synthetic EthR inhibitors boost antituberculous activity of ethionamide. *Nature medicine* 15: 537–544. doi: [10.1038/nm.1950](#) PMID: [19412174](#)
11. Lechartier B, Rybníček J, Zumla A, Cole ST (2014) Tuberculosis drug discovery in the post-post-genomic era. *EMBO molecular medicine* 6: 158–168. doi: [10.1002/emmm.201201772](#) PMID: [24401837](#)
12. Daffe M, Draper P (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in microbial physiology* 39: 131–203. PMID: [9328647](#)
13. Marrakchi H, Laneelle MA, Daffe M (2014) Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem Biol* 21: 67–85. doi: [10.1016/j.chembiol.2013.11.011](#) PMID: [24374164](#)
14. Sacco E, Covarrubias AS, O'Hare HM, Carroll P, Eynard N, Jones TA, et al. (2007) The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14628–14633. PMID: [17804795](#)
15. Brown AK, Bhatt A, Singh A, Saparia E, Evans AF, Besra GS (2007) Identification of the dehydratase component of the mycobacterial mycolic acid-synthesizing fatty acid synthase-II complex. *Microbiology* 153: 4166–4173. PMID: [18048930](#)
16. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Molecular microbiology* 48: 77–84. PMID: [12657046](#)
17. Zhang YJ, Iorger TR, Huttenhower C, Long JE, Sassetti CM, Sacchettini JC, et al. (2012) Global assessment of genomic regions required for growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 8: e1002946. doi: [10.1371/journal.ppat.1002946](#) PMID: [23028335](#)
18. Slama N, Jamet S, Frigui W, Pawlik A, Bottai D, Laval F, et al. (2015) The changes in mycolic acid structures caused by hadC mutation have a dramatic effect on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*.
19. Grzegorzewicz AE, Kordulakova J, Jones V, Born SE, Belardinelli JM, Vaquie A, et al. (2012) A common mechanism of inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid biosynthetic pathway by isoxyl and thiacetazone. *The Journal of biological chemistry* 287: 38434–38441. doi: [10.1074/jbc.M112.400994](#) PMID: [23002234](#)
20. Urbancik B (1970) Clinical experience with thiocarlide (Isoxyl). *Antibiotica et chemotherapia Fortschritte Advances Progres* 16: 117–123. PMID: [5535608](#)
21. Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB (2010) Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *The Lancet Infectious diseases* 10: 621–629. doi: [10.1016/S1473-3099\(10\)70139-0](#) PMID: [20797644](#)
22. Wallace RJ Jr., Nash Donald R., Tsukamura Michio, Blacklock Zeta M., and Silcox Vella A. (1988) Human disease due to *Mycobacterium smegmatis*. *The Journal of infectious diseases* 158: 52–58. PMID: [3392420](#)



23. Bercovier H, Vincent V (2001) Mycobacterial infections in domestic and wild animals due to *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. farcinogenes*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. simiae* and *M. genavense*. *Revue scientifique et technique* 20: 265–290. PMID: [11288516](#)
24. Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. (2002) Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical microbiology reviews* 15: 716–746. PMID: [12364376](#)
25. Gutierrez MC, Supply P, Brosch R (2009) Pathogenomics of mycobacteria. *Genome Dyn* 6: 198–210. doi: [10.1159/000235772](#) PMID: [19696503](#)
26. Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, Jacobs WR Jr., (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 4: 1911–1919. PMID: [2082148](#)
27. van Kessel JC, Hatfull GF (2007) Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods* 4: 147–152. PMID: [17179933](#)
28. Jamet S, Quentin Y, Coudray C, Texier P, Laval F, Daffe M, et al. (2015) Evolution of Mycolic Acid Biosynthesis Genes and Their Regulation during Starvation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology* 197: 3797–3811. doi: [10.1128/JB.00433-15](#) PMID: [26416833](#)
29. Kulka K, Hatfull G, Ojha AK (2012) Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms. *Journal of visualized experiments: JoVE*.
30. Xu WX, Zhang L, Mai JT, Peng RC, Yang EZ, Peng C, et al. (2014) The Wag31 protein interacts with AccA3 and coordinates cell wall lipid permeability and lipophilic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemical and biophysical research communications* 448: 255–260. doi: [10.1016/j.bbrc.2014.04.116](#) PMID: [24792177](#)
31. Laval F, Haïtes R, Movahedzadeh F, Lemassu A, Wong CY, Stoker N, et al. (2008) Investigating the function of the putative mycolic acid methyltransferase UmaA: divergence between the *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *The Journal of biological chemistry* 283: 1419–1427. PMID: [18006503](#)
32. Daffe M, Laneelle MA, Asselineau C, Levy-Frebault V, David H (1983) [Taxonomic value of mycobacterial fatty acids: proposal for a method of analysis]. *Annales de microbiologie* 134B: 241–256. PMID: [6651121](#)
33. Laval F, Laneelle MA, Deon C, Monsarrat B, Daffe M (2001) Accurate molecular mass determination of mycolic acids by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical chemistry* 73: 4537–4544. PMID: [11575804](#)
34. Dahl JL, Lau Bonilla D (2011) The wag31 gene of *Mycobacterium tuberculosis* is positively regulated by the stringent response. *FEMS microbiology letters* 319: 153–159. doi: [10.1111/j.1574-6968.2011.02278.x](#) PMID: [21470298](#)
35. Recht J, Martinez A, Torello S, Kolter R (2000) Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology* 182: 4348–4351. PMID: [10894747](#)
36. Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Laneelle MA, Triccas JA, Gicquel B, et al. (2001) Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *The Journal of biological chemistry* 276: 19845–19854. PMID: [11279114](#)
37. Nikaido H, Vaara M (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological reviews* 49: 1–32. PMID: [2580220](#)
38. Liu J, Barry CE 3rd, Besra GS, Nikaido (1996) Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *The Journal of biological chemistry* 271: 29545–29551. PMID: [8939881](#)
39. Magnuson K, Jackowski S, Rock CO, Cronan JE Jr., (1993) Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* 57: 522–542. PMID: [8246839](#)
40. Jarlier V, Nikaido H (1990) Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *Journal of bacteriology* 172: 1418–1423. PMID: [2307653](#)
41. Nguyen L, Pieters J (2009) Mycobacterial subversion of chemotherapeutic reagents and host defense tactics: challenges in tuberculosis drug development. *Annual review of pharmacology and toxicology* 49: 427–453. doi: [10.1146/annurev-pharmtox-061008-103123](#) PMID: [19281311](#)
42. Brennan PJ, Nikaido H (1995) The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry* 64: 29–63. PMID: [7574484](#)
43. Vilcheze C, Jacobs WR Jr. (2007) The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annual review of microbiology* 61: 35–50. PMID: [18035606](#)
44. Takayama K, Kilburn JO (1989) Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 33: 1493–1499. PMID: [2817850](#)

45. Danilchanka O, Pavlenok M, Niederweis M (2008) Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52: 3127–3134. doi: [10.1128/AAC.00239-08](https://doi.org/10.1128/AAC.00239-08) PMID: [18559650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18559650/)
46. Daffe M (2015) The cell envelope of tubercle bacilli. *Tuberculosis*.
47. Biswas R, Dutta A, Dutta D, Hazra D, Banerjee DR, Basak A, et al. (2015) Crystal structure of dehydratase component HadAB complex of mycobacterial FAS-II pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 458: 369–374. doi: [10.1016/j.bbrc.2015.01.119](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.119) PMID: [25656575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25656575/)
48. Carrere-Kremer S, Blaise M, Singh VK, Alibaud L, Tuaillon E, Halloum I, et al. (2015) A new dehydratase conferring innate resistance to thiacetazone and intra-amoebal survival of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular microbiology* 96: 1085–1102. doi: [10.1111/mmi.12992](https://doi.org/10.1111/mmi.12992) PMID: [25754266](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25754266/)
49. Kansal RG, Gomez-Flores R, Mehta RT (1998) Change in colony morphology influences the virulence as well as the biochemical properties of the *Mycobacterium avium* complex. *Microbial pathogenesis* 25: 203–214. PMID: [9817824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9817824/)
50. Catherinot E, Clarissou J, Etienne G, Ripoll F, Emile JF, Daffe M, et al. (2007) Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infection and immunity* 75: 1055–1058. PMID: [17145951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17145951/)
51. Belisle JT, Brennan PJ (1989) Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *Journal of bacteriology* 171: 3465–3470. PMID: [2722755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2722755/)
52. van der Woude AD, Sarkar D, Bhatt A, Sparrius M, Raadsen SA, Boon L, et al. (2012) Unexpected link between lipooligosaccharide biosynthesis and surface protein release in *Mycobacterium marinum*. *The Journal of biological chemistry* 287: 20417–20429. doi: [10.1074/jbc.M111.336461](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.336461) PMID: [22505711](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22505711/)
53. Martinez A, Torello S, Kolter R (1999) Sliding motility in mycobacteria. *Journal of bacteriology* 181: 7331–7338. PMID: [10572138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10572138/)
54. Marsollier L, Brodin P, Jackson M, Kordulakova J, Tafelmeyer P, Carbonnelle E, et al. (2007) Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS pathogens* 3: e62. PMID: [17480118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17480118/)
55. Lenaerts AJ, Hoff D, Aly S, Ehlers S, Andries K, Cantarero L, et al. (2007) Location of persisting mycobacteria in a Guinea pig model of tuberculosis revealed by r207910. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51: 3338–3345. PMID: [17517834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17517834/)
56. Islam MS, Richards JP, Ojha AK (2012) Targeting drug tolerance in mycobacteria: a perspective from mycobacterial biofilms. *Expert review of anti-infective therapy* 10: 1055–1066. doi: [10.1586/eri.12.88](https://doi.org/10.1586/eri.12.88) PMID: [23106280](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23106280/)
57. Sambandan D, Dao DN, Weinrick BC, Vilcheze C, Gurucha SS, Ojha A, et al. (2013) Keto-mycolic acid-dependent pellicle formation confers tolerance to drug-sensitive *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* 4: e00222–00213. doi: [10.1128/mBio.00222-13](https://doi.org/10.1128/mBio.00222-13) PMID: [23653446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23653446/)
58. Ojha A, Anand M, Bhatt A, Kremer L, Jacobs WR Jr., Hatfull GF (2005) GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell* 123: 861–873. PMID: [16325580](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16325580/)
59. Zheng H, Lu L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhu G, et al. (2008) Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One* 3: e2375. doi: [10.1371/journal.pone.0002375](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002375) PMID: [18584054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18584054/)
60. Kremer L, Guerardel Y, Gurucha SS, Loch C, Besra GS (2002) Temperature-induced changes in the cell-wall components of *Mycobacterium thermoresistibile*. *Microbiology* 148: 3145–3154. PMID: [12368448](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12368448/)
61. Stratton HM, Brooks PR, Carr EL, Seviour RJ (2003) Effects of culture conditions on the mycolic acid composition of isolates of *Rhodococcus* spp. from activated sludgefoams. *Systematic and applied microbiology* 26: 165–171. PMID: [12866841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12866841/)
62. Baba T, Kaneda K, Kusunose E, Kusunose M, Yano I (1989) Thermally adaptive changes of mycolic acids in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of biochemistry* 106: 81–86. PMID: [2777756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2777756/)
63. Alibaud L, Alahari A, Trivelli X, Ojha AK, Hatfull GF, Guerardel Y, et al. (2010) Temperature-dependent regulation of mycolic acid cyclopropanation in saprophytic mycobacteria: role of the *Mycobacterium smegmatis* 1351 gene (MSMEG\_1351) in CIS-cyclopropanation of alpha-mycolates. *The Journal of biological chemistry* 285: 21698–21707. doi: [10.1074/jbc.M110.125724](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.125724) PMID: [20457615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20457615/)
64. Grzegorzewicz AE, Eynard N, Quemard A, North EJ, Margolis A, Lindenberger JJ, et al. (2015) Covalent modification of the FAS-II dehydratase by Isoxyl and Thiacetazone. *ACS infectious diseases* 1: 91–97.
65. Cantaloube S, Veyron-Churlet R, Haddache N, Daffe M, Zerbib D (2011) The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II dehydratases and methyltransferases define the specificity of the mycolic acid elongation complexes. *PLoS One* 6: e29564. doi: [10.1371/journal.pone.0029564](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029564) PMID: [22216317](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22216317/)

66. Veyron-Churlet R, Guerrini O, Mourey L, Daffe M, Zerbib D (2004) Protein-protein interactions within the Fatty Acid Synthase-II system of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for mycobacterial viability. *Mol Microbiol* 54: 1161–1172. PMID: [15554959](#)
67. Healy VL, Lessard IA, Roper DI, Knox JR, Walsh CT (2000) Vancomycin resistance in enterococci: reprogramming of the D-ala-D-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Chemistry & biology* 7: R109–119.
68. Liu J, Nikaido H (1999) A mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 4011–4016. PMID: [10097154](#)
69. Stahl C, Kubetzko S, Kaps I, Seeber S, Engelhardt H, Niederweis M (2001) MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular microbiology* 40: 451–464. PMID: [11309127](#)
70. Trias J, Benz R (1994) Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular microbiology* 14: 283–290. PMID: [7830572](#)
71. Weiss LA, Stallings CL (2013) Essential roles for *Mycobacterium tuberculosis* Rel beyond the production of (p)ppGpp. *Journal of bacteriology* 195: 5629–5638. doi: [10.1128/JB.00759-13](#) PMID: [24123821](#)
72. Coxon GD, Craig D, Corrales RM, Vialla E, Gannoun-Zaki L, Kremer L (2013) Synthesis, antitubercular activity and mechanism of resistance of highly effective thiacetazone analogues. *PLoS One* 8: e53162. doi: [10.1371/journal.pone.0053162](#) PMID: [23301038](#)
73. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. (2007) An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine* 175: 367–416. PMID: [17277290](#)
74. Shahab FM, Kobarfard F, Shafaghi B, Dadashzadeh S (2010) Preclinical pharmacokinetics of KBF611, a new antituberculosis agent in mice and rabbits, and comparison with thiacetazone. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 40: 225–234. doi: [10.3109/00498250903461411](#) PMID: [20038272](#)
75. Phetsuksiri B, Baulard AR, Cooper AM, Minnikin DE, Douglas JD, Besra GS, et al. (1999) Antimycobacterial activities of isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43: 1042–1051. PMID: [10223912](#)

**C. Article :** "The change in mycolic acid structure caused by *hadC* mutation have a dramatic effect on virulence of *Mycobacterium tuberculosis*"



# The changes in mycolic acid structures caused by *hadC* mutation have a dramatic effect on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*

Nawel Slama,<sup>1,2</sup> Stevie Jamet,<sup>1,2</sup> Wafa Frigui,<sup>3</sup> Alexandre Pawlik,<sup>3</sup> Daria Bottai,<sup>3†</sup> Françoise Laval,<sup>1,2</sup> Patricia Constant,<sup>1,2</sup> Anne Lemassu,<sup>1,2</sup> Kaymeuang Cam,<sup>1,2</sup> Mamadou Daffé,<sup>1,2</sup> Roland Brosch,<sup>3</sup> Nathalie Eynard<sup>1,2\*</sup> and Annaïk Quémard<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Département Tuberculose & Biologie des Infections, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale – UMR5089, Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, France.

<sup>2</sup>Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

<sup>3</sup>Institut Pasteur, Unit for Integrated Mycobacterial Pathogenomics, Paris, France.

***sis* virulence make HadBC an attractive therapeutic target for tuberculosis drug development.**

## Introduction

The envelope of the tubercle bacillus forms a thick and highly impermeable coat, exceptionally rich in exotic lipids, which play pivotal roles in pathogenicity (Daffé and Draper, 1998; Verschoor *et al.*, 2012) and make this agent of tuberculosis (TB) particularly resistant against the host immune system and common antibiotics. Despite recent progress in the elucidation of pathogenicity mechanisms, TB remains a major health problem worldwide with 9 million active TB cases and 1.5 million deaths in 2013 (WHO, 2014). The emergence of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) strains severely compromises conventional TB chemotherapy (WHO, 2014). Against this background, it appears important to clarify the molecular bases of infection by this pathogen.

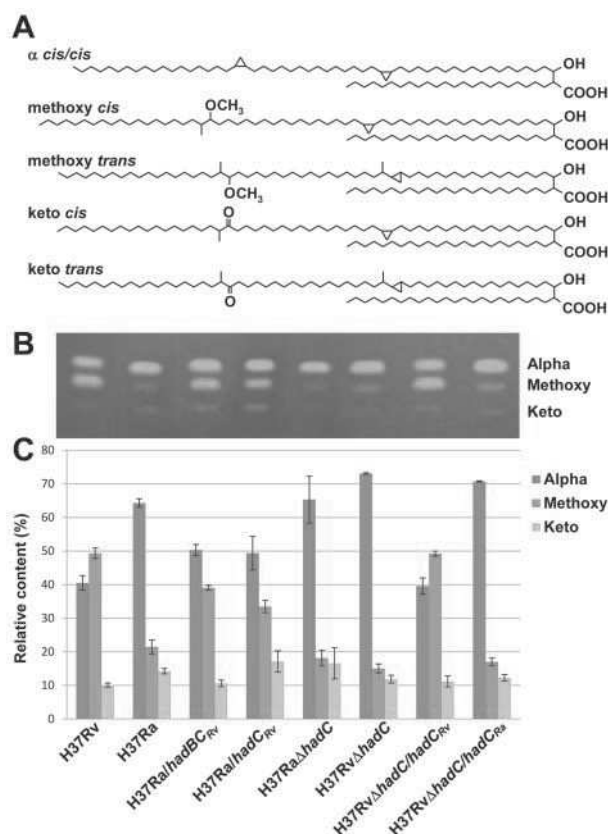
In the 1930s, the *Mtb* patient isolate H37 was dissociated into an avirulent variant, H37Ra, and a virulent variant, H37Rv, by serial passages on different media (Steenken *et al.*, 1934; Steenken and Gardner, 1946). Strain *Mtb* H37Ra displays a distinct colony morphology and does not form the characteristic cords usually observed for *Mtb* (Middlebrook *et al.*, 1947). It is infectious but does not replicate in macrophages (McDonough *et al.*, 1993) and exhibits reduced virulence in animal models (guinea pig and mice) (Steenken *et al.*, 1934; Larson and Wicht, 1964; Alsaadi and Smith, 1973). In attempts to understand the mechanisms underlying the pathogenesis, genomic and transcriptomic approaches have been used to compare the virulent strain *Mtb* H37Rv with its avirulent counterpart *Mtb* H37Ra (Brosch *et al.*, 1999; Rindi *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2004; Mostowy *et al.*, 2004). However, the involvement of the genetic variations identified in the attenuation of *Mtb* H37Ra *in vivo* remained unclear. In 2008, three parallel surveys extended the investigations by seeking single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *Mtb* H37Ra genome relative to virulent *Mtb* strains (Frigui *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008). Many genetic variations were found to be potential strain-specific sequence polymorphisms of the *Mtb* H37Rv reference strain or

## Summary

Understanding the molecular strategies used by *Mycobacterium tuberculosis* to invade and persist within the host is of paramount importance to tackle the tuberculosis pandemic. Comparative genomic surveys have revealed that *hadC*, encoding a subunit of the HadBC dehydratase, is mutated in the avirulent *M. tuberculosis* H37Ra strain. We show here that mutation or deletion of *hadC* affects the biosynthesis of oxygenated mycolic acids, substantially reducing their production level. Additionally, it causes the loss of atypical extra-long mycolic acids, demonstrating the involvement of HadBC in the late elongation steps of mycolic acid biosynthesis. These events have an impact on the morphotype, cording capacity and biofilm growth of the bacilli as well as on their sensitivity to agents such as rifampicin. Furthermore, deletion of *hadC* leads to a dramatic loss of virulence: an almost 4-log drop of the bacterial load in the lungs and spleens of infected immunodeficient mice. Both its unique function and importance for *M. tuberculo-*

Accepted 2 November, 2015. \*For correspondence. E-mail annaïk.quémard@ipbs.fr, nathalie.eynard@ipbs.fr; Tel. (+33) 561 175 576, (+33) 561 175 577; Fax (+33) 561 175 580. †Present address: Dipartimento di Ricerca Traslationale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, University of Pisa, Italy.

sequencing errors. Nevertheless, it was found that the attenuation of strain *Mtb* H37Ra was probably due to several distinct genetic lesions; three SNPs were identified as H37Ra-specific mutations (Lee *et al.*, 2008). One was located in *phoP* (*Rv0757*), impairing the DNA-binding capacity of the PhoP/PhoR two-component virulence regulator and consequently the secretion of the 6-kD early-secreted antigenic target ESAT-6 (Frigui *et al.*, 2008), a key antigen and virulence factor of *Mtb* (Pym *et al.*, 2002). Another mutation mapped in the *Rv0101* gene that encodes a putative non-ribosomal peptide synthase and is part of the *Rv0096-Rv0101* operon, essential for the biosynthesis of another kind of virulence factor, the phthiocerol dimycocerosates, and for *Mtb* survival in mouse macrophages and guinea pigs (Hotter *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). The third mutation is an *Mtb* H37Ra-specific nucleotide insertion in gene *Rv0637* (*hadC*) (Lee *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008), which is of particular interest as this gene belongs to the essential *Rv0635-Rv0636-Rv0637* (*hadA-hadB-hadC*) gene cluster that encodes the hot dog folded proteins HadA, HadB and HadC (Sacco *et al.*, 2007). These proteins are the subunits of two heterodimeric dehydratases, HadAB and HadBC, of the hydratase 2 family, corresponding to a new type of structure in bacteria. They are part of *Mtb* fatty acid synthase type II (FAS-II) system and catalyze the step of (3*R*)-hydroxyacyl-ACP dehydration (Sacco *et al.*, 2007) (Fig. S1). The mycobacterial FAS-II system has a unique function of fatty acid elongation and is involved in the biosynthesis of mycolic acids (MAs) (Fig. S1), which are very long chain ( $C_{74}$ – $C_{89}$  in *Mtb*)  $\alpha$ -alkyl  $\beta$ -hydroxy fatty acids (Marrakchi *et al.*, 2014) (Fig. 1A). MAs are the major components of the outer membrane (mycomembrane), contributing to the architecture and the permeability of the mycobacterial envelope (Daffé and Draper, 1998; Gebhardt *et al.*, 2007). They are important for *Mtb* virulence and persistence in the infected host, either as free acids or integrated into complex lipids such as trehalose dimycolate (Dubnau *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2006; Riley, 2006; Bhatt *et al.*, 2007; Dao *et al.*, 2008; Vander Beken *et al.*, 2011; Verschoor *et al.*, 2012). The main hydrocarbon chain ( $C_{48}$ – $C_{63}$  in *Mtb*), called the 'meromycolic chain', of MAs has various functions introduced by a family of specialized methyltransferases at proximal and distal positions with respect to the carboxyl group, thus defining different types of MAs. The *Mtb* complex is characterized by a combination of three major types of MAs: the  $\alpha$ -MAs mostly with two *cis*-cyclopropane rings, the methoxy-MAs carrying a methoxy group and a *cis*- or *trans*-cyclopropane ring, and the keto-MAs with a keto function and a *cis*- or *trans*-cyclopropane ring (Marrakchi *et al.*, 2014) (Fig. 1A). Subtle differences in the structure of the chemical groups and the chain length of MAs are determinant for their biological activities, implicated at different steps of the *Mtb*



**Fig. 1.** Mycolic acids of *M. tuberculosis* and impact of *hadC* mutation on their relative distribution.

MA distribution is strongly affected by *hadC* mutation or deletion (in *Mtb* H37Ra and *Mtb* H37RvΔ*hadC*), with a decrease in the methoxy-MA content compensated by an increase in  $\alpha$ -MAs. The partial or total complementation obtained using a wt *hadC<sub>Rv</sub>* allele shows that this phenomenon is the direct consequence of *hadC* inactivity in the mutants.

A. Structures of the main MAs from virulent *M. tuberculosis*.

B. TLC analysis of MA profile in the different *Mtb* strains studied.

The strain order is that indicated in panel C. One representative TLC picture. Ten micrograms of each sample of extracted mycolic acid methyl esters (MAMEs) was loaded. Eluent: petroleum ether/diethyl ether, 9/1, 5 runs; staining: primuline.

C. Relative distribution of MAs in the different strains. The band intensities obtained in panel B and other TLC replicates were measured. Data are means of at least three independent experiments  $\pm$  average deviations. *HadC<sub>Rv</sub>*, *hadC* gene from *Mtb* H37Rv; *hadC<sub>Ra</sub>*, *hadC* gene from *Mtb* H37Ra.

infectious process (Dubnau *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2006; Riley, 2006; Bhatt *et al.*, 2007; Vander Beken *et al.*, 2011; Verschoor *et al.*, 2012). MAs are involved in the pathogenicity of mycobacteria suggesting that there might be a link between the mutation in *hadC* and the attenuation of *Mtb* H37Ra. We therefore investigated the biological function and importance for virulence of the HadC protein, which is highly conserved in different lineages of the *Mtb* complex and even in the more distantly related *M. canettii* strains (Supply *et al.*, 2013; Boritsch *et al.*, 2014).

## Results

### *The hadABC locus in M. tuberculosis H37Ra*

Bioinformatic analyses of *Mtb* H37Ra genome with BlastP program using sequences of *Mtb* H37Rv as probes revealed that all genes encoding the proteins known to be involved in the biosynthesis of MAs are present in the H37Ra genome. These analyses also showed an overall conservation of the corresponding peptidic sequences, which only differed for the *hadABC* locus (Table S1). Indeed, genomic surveys of *Mtb* H37Ra (referred to as strain ATCC 25177 in both publications) described a 1 bp insertion in the *MRA0648* gene, the orthologue of the *Rv0637* (*hadC*) gene of *Mtb* H37Rv (Lee *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008). In only one of these two studies, a 5 bp deletion in *MRA0646*, the orthologue of *Rv0635* (*hadA*), was also reported (Zheng *et al.*, 2008). This discrepancy might be linked either to sequencing errors or to the use of different *Mtb* H37Ra variants derived from the same parent strain by repeated subcultures. During the present work, we used *Mtb* H37Ra strain CIP 103471 from the Institut Pasteur Collection (Frigui *et al.*, 2008). Sequencing of the *hadABC* region of that strain revealed that both *hadA* and *hadB* copies were strictly identical to those of *Mtb* H37Rv reference sequence (Cole *et al.*, 1998), in agreement with Lee *et al.* (2008). The *hadC* allele of that *Mtb* H37Ra strain contains the previously reported single nucleotide insertion (C) in a GC rich region at base pair 88 (*Rv0637* numbering); it causes a frameshift in *MRA0648*, generating an early stop codon (Fig. S2).

### *Influence of the hadC mutation on the mycolic acid profile*

The consequences of *hadC* mutation on the MAs produced by *Mtb* H37Ra were investigated. The absolute content of MAs in *Mtb* H37Ra (ratio MA/delipidated bacterial residue dry weight:  $11.3 \pm 0.4\%$ ) was not different to that in *Mtb* H37Rv ( $11.3 \pm 1.1\%$ ). In contrast, major changes in the relative abundances of the three MA classes were observed (Fig. 1B and C). The percentage of methoxy-MA strongly decreased in *Mtb* H37Ra (21% versus 49% in H37Rv), compensated by substantially more  $\alpha$ -MAs (64%) than in *Mtb* H37Rv (41%) (Fig. 1B and C). Hence, the ratio  $\alpha$ -MAs:oxygenated-MAs was 1.8 in H37Ra versus 0.7 in H37Rv. Complementation of *Mtb* H37Ra with either the wild-type (wt) *hadC* (*hadC<sub>Rv</sub>*) or both wt *hadB* and *hadC* allele(s) (*hadBC<sub>Rv</sub>*) from *Mtb* H37Rv resulted in similar intermediate phenotypes (Fig. 1B and C). To confirm the direct involvement of the *hadC* gene in the relative distribution of MAs in *Mtb*, a deletion mutant was constructed in strain H37Rv, and named H37Rv $\Delta$ *hadC*. The mutant was viable, showing that *hadC* is not essential for *Mtb* growth in

culture. *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC* displayed a phenotype similar but even more marked than that of H37Ra, with a ratio  $\alpha$ -MAs:oxygenated-MAs of 2.7 (Fig. 1B and C). The complemented strain *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC*/*hadC<sub>Rv</sub>* recovered the MA profile of wt H37Rv (Fig. 1B and C). Thus, the abnormalities of the MA production by *Mtb* H37Ra are a direct consequence of the insertion in the *hadC* allele. Consistent with this, no complementation was observed after transformation of *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC* with *hadC* allele from *Mtb* H37Ra (*hadC<sub>Ra</sub>*), and the complete deletion of this allele in H37Ra did not significantly affect the MA distribution (Fig. 1B and C), providing further evidence of the inactivity of the *hadC* gene of H37Ra.

### *Effects of hadC mutation on the fine structure of standard-sized (C<sub>74</sub>–C<sub>91</sub>) mycolic acids*

To determine the fine structure of the MAs in the *hadC* mutant strains, they were purified and analyzed as MA methyl esters (MAMEs) by both MALDI-TOF MS and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. The structures of the methoxy and keto-MAs in both *Mtb* H37Ra and *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC* showed large differences to those in H37Rv wt. Both mutant strains exhibited a total loss of the *trans*-cyclopropane rings (Table 1). Moreover, the oxygenated MAMEs displayed an abnormal degree of unsaturation affecting the *cis*-cyclopropanes and, in some cases, the double bonds, with a global increase of about 50% relative to *Mtb* H37Rv molecules (Table 1). This suggested that half of the oxygenated mycolates possessed an additional unsaturation. Consistent with these observations, two new series of molecules appeared on mass spectra of methoxy-MAMEs from *Mtb* H37Ra (Fig. 2, *green and red labels*). One series mainly carried an extra cyclopropane ring (Fig. 2, *red labels*, increment of 12 Da), and the other series possessed an extra double bond (Fig. 2, *green labels*, loss of 2 Da). The same phenomenon was observed for the keto-MAMEs (Fig. S3). The phenotype of the *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC* mutant was similar but more severe, and the introduction of an additional cyclopropane prevailed over the addition of a double bond (Table 1, Fig. 2 and Fig. S3, *red labels*). The longest monocyclopropanated methoxy- and keto-MAs (C<sub>85</sub>–C<sub>89</sub> and C<sub>84</sub>–C<sub>88</sub> respectively) observed in *Mtb* H37Rv wt (Fig. 2 and Fig. S3, *black labels*) were for a large part supplanted by dicyclopropanated MAs of similar sizes (C<sub>86</sub>–C<sub>90</sub> and C<sub>85</sub>–C<sub>89</sub> respectively) in *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC* (Fig. 2 and Fig. S3, *red labels*). Thus, while the fine structures of the oxygenated MAs differed in both *Mtb* H37Ra and *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC* compared with H37Rv, the chain lengths of their carbon skeleton remained roughly the same (Fig. 2 and Fig. S3). Interestingly, we also observed weak MS signals corresponding to oxygenated MAs with three unsaturations (loss of 4 mass units) in both *Mtb* H37Ra and *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC* (Fig. 2 and



**Table 1.** <sup>1</sup>H-NMR analysis of the unsaturations in the mycolic acids of the *M. tuberculosis* strains.

MAME	Chemical shifts (ppm)	H37Rv			H37Ra			H37Ra/hadC <sub>Rv</sub>			H37RvΔhadC			H37RvΔhadC/hadC <sub>Rv</sub>		
		α	methoxy	keto	α	methoxy	keto	α	methoxy	keto	α	methoxy	keto	α	methoxy	keto
Cyclopropane #/molecule <sup>a</sup>		1.93	1.01	1.01	1.96	1.26	1.40	1.88	0.99	1.19	2.08	1.43	1.65	2.00	1.00	1.05
cis (%) <sup>b</sup>	-0.338	100	92	74	100	100	100	100	84	56	100	100	100	100	96	78
trans (%) <sup>b</sup>	0.637	–	8	26	–	–	–	–	16	44	–	–	–	–	4	22
	0.555															
	0.111															
	0.168															
	0.438															
Double bond (cis <sup>c</sup> ) #/molecule <sup>a</sup>	5.34	ND	ND	traces	0.13	0.29	0.12	ND	ND	ND	0.16	traces	traces	ND	ND	ND
Total unsaturation #/molecule <sup>d</sup>		1.93	1.01	1.01	2.09	1.55	1.52	1.88	0.99	1.19	2.24	1.43	1.65	2.00	1.00	1.05

a. The degree of unsaturation (double bond or cyclopropane) per molecule was determined by integration of the NMR signal areas, using the 3 protons of the methyl ester function of MAMES as an internal standard.

b. Relative distribution.

c. The detected double bonds had always a *cis* configuration.

d. In the standard MAs (as those of *Mtb* H37Rv), the degree of unsaturation is equivalent to 1 for methoxy- and keto-MAs and 2 for α-MAs. ND: not detected.

Fig. S3, *purple labels*). As for the α-MAs from both *hadC*-deficient strains, their structure differed less from those from *Mtb* H37Rv. Still, two minor series of atypical triunsaturated α-MAs were detected by MALDI-TOF MS (Fig. S3, *green and red labels*); this correlated with a slight increase in the overall degree of unsaturation (Table 1).

The position of the double bond(s) in a hydrocarbon chain can be determined by oxidative cleavage (von Rudloff, 1956). This method was applied to the ethylenic methoxy-MAs of *Mtb* H37Ra purified by preparative argention TLC. After cleavage and methylation, the distal part of the MAs yields fatty acid methyl esters (FAMES) and the proximal part gives dicarboxylic acid methyl esters (DAMES) (von Rudloff, 1956) (Fig. S4). The cleavage products of the methoxy-MAs were purified and analyzed by MALDI-TOF MS and <sup>1</sup>H NMR (Table S2). As expected, the FAMES (distal part) carried a methoxy function and no unsaturation (Table S2 and Fig. S4). The major DAME series (proximal part) carried one *cis*-cyclopropane, but a minor DAME series carrying a *cis*-double bond was also detected (Table S2 and Fig. S4). These data allowed determination of the structure of the ethylenic methoxy-MAs of *Mtb* H37Ra, which possess two unsaturations, and the likely structure of the major dicyclopropanated methoxy-MAs could be inferred (Fig. S4). The sizes of the MAs as deduced from the lengths of the cleavage fragments (Table S2 and Fig. S4) were perfectly consistent with the sizes of the intact MAs defined by MALDI-TOF MS (Fig. 2).

Again, complementation with *hadC<sub>Rv</sub>* and *hadBC<sub>Rv</sub>* had similar consequences, and the complemented versions of *Mtb* H37Ra and H37RvΔ*hadC* had phenotypes comparable with that of *Mtb* H37Rv wt (Fig. 2 and Fig. S3). This shows that the abnormalities of MA fine structure in the mutant strains were direct consequences of the *hadC* mutation. Consistent with this, no mutation was detected by sequencing the genes coding for the eight methyltransferases of H37Ra, the enzymes which introduce specific functions (including cyclopropane rings, double bonds and methyl branches) into the meromycolic chain of MAs.

In conclusion, the important reduction of the oxygenated MA global content in both *hadC*-deficient strains is accompanied by major modifications of MA fine structures. *HadC* mutations specifically induce the production of anomalous methoxy- and keto-MAs bearing two unsaturations. The structure of the α-MAs was much less affected. The fact that keto- and methoxy-MAs have similar structural modifications correlates with their biosynthetic filiation. Indeed, they are produced by a common pathway depending on Hma (MmaA4) methyltransferase (Dinadayala *et al.*, 2003). For this reason, the contents of keto- and methoxy-MAs are interdependent; thus, their sum is quite stable for a given strain cultivated in defined culture conditions, whereas their relative

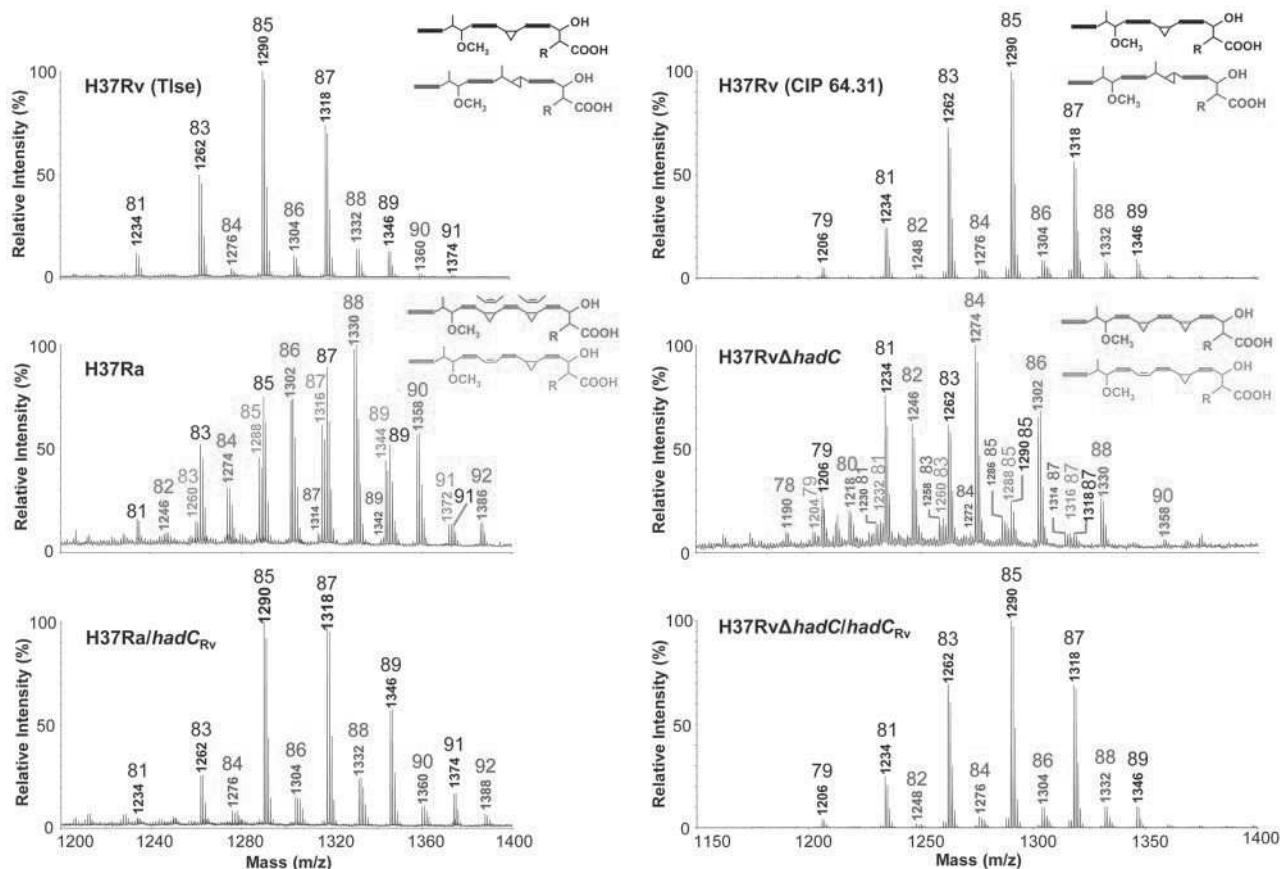


Fig. 2. Impact of *hadC* mutation on the fine structure of standard-sized methoxy-mycolic acids.

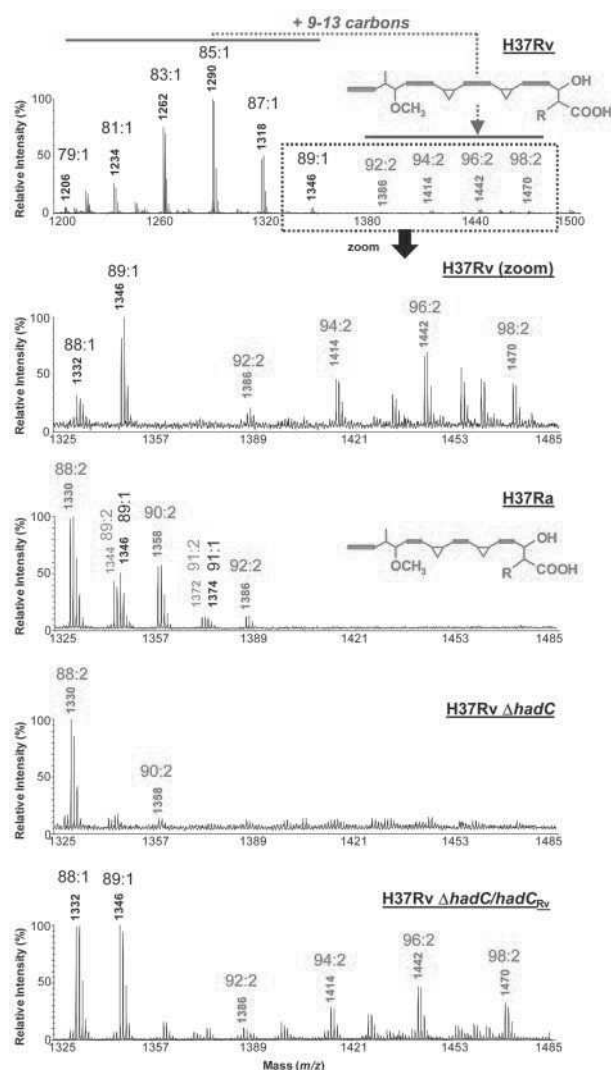
MALDI-TOF MS analysis of the purified MAMEs. In both *hadC*-deficient strains, *Mtb* H37Ra and *Mtb* H37RvΔ*hadC*, unusual methoxy-MAs bearing an additional unsaturation (*cis*-cyclopropane or *cis*-double bond) are produced. These structural modifications are specifically linked to *hadC* mutation or deletion, as shown by the recovery of the wt phenotype after complementation by *hadC* from *Mtb* H37Rv. Black labels, *cis*-monocyclopropanated MAMEs; blue labels, *trans*-monocyclopropanated MAMEs; green labels, *cis*-cyclopropanated *cis*-ethylenic MAMEs; red labels, *cis,cis*-dicyclopropanated or *cis,cis*-diethylenic MAMEs (traces of the latter if any in *Mtb* H37RvΔ*hadC*); purple labels, triunsaturated MAMEs. Schematics of the molecules are drawn in matching colors; thick lines represent saturated hydrocarbon chains. See examples of detailed formula in Fig. 1A. The carbon numbers mentioned above *m/z* values are those of the free MAs. To exemplify variations within *Mtb* H37Rv strain, two variants, CIP 64.31 and Tlse (see Supporting Experimental Procedures), were analyzed. Although their phenotypes were very similar, it is noteworthy that the MAs from *Mtb* H37Rv CIP 64.31 were 2-carbon shorter than those from *Mtb* H37Rv Tlse.

amounts may vary (Davidson *et al.*, 1982). This regulation process may explain why the percentage of keto-MAs stay almost unchanged in *hadC*-deficient strains, whereas that of methoxy-MAs is greatly reduced (Fig. 1C).

#### Involvement of *hadC* gene in the biosynthesis of atypical extra-long mycolic acids

In a previous study, we have shown that the purified HadBC heterodimer has a predilection for longer chain substrates as compared with HadAB enzyme (Sacco *et al.*, 2007). Furthermore, the genera of the *Corynebacteriales* order producing medium chain MAs (C<sub>34</sub>–C<sub>60</sub>), like *Rhodococcus* and *Nocardia*, carry *hadA* and *hadB* orthologues but do not have a *hadC* orthologue. Therefore, we have hypothesized that HadBC enzyme is involved in the

late elongation cycles catalyzed by FAS-II, and HadAB in early elongation steps (Sacco *et al.*, 2007) (Fig. S1). Unexpectedly however, *hadC* mutations in both *Mtb* H37Ra and H37RvΔ*hadC* were not associated with a general shortening of the MA chain length (Fig. 2 and Fig. S3) despite the major effects on their structure, as shown above. Strikingly, very high mass signals of low intensity were reproducibly detected in the MALDI-TOF mass spectra of the purified methoxy-, keto and  $\alpha$ -MAs from *Mtb* H37Rv (Fig. 3 and Fig. S5). They corresponded to series of atypical extra-long MAs (XL-MAs) with 9–13 more carbons than the major standard-sized MAs (Fig. 3 and Fig. S5). Since the meromycolic chains are elongated by successive additions of two carbons (Fig. S1), this increment of an odd number of carbons indicated that the XL-MAs carried an additional cyclopropane, and were



**Fig. 3.** Impact of *hadC* mutation on the fine structure of extra-long methoxy-mycolic acids.

MALDI-TOF MS analysis of purified methoxy-MAMEs. Unusually long MAs (XL-MAs,  $C_{92:2}$ – $C_{98:2}$ ) were detected in virulent *Mtb* H37Rv. They disappear in *hadC*-deficient strains (*Mtb* H37Ra and H37Rv $\Delta$ *hadC*). Red labels, *cis,cis*-dicyclopropanated or *cis,cis*-diethylenic MAMEs (only in H37Ra); green labels, *cis*-cyclopropanated *cis*-ethylenic MAMEs; black labels, *cis*-monocyclopropanated MAMEs. Schematics of the molecules are drawn in matching colors; thick lines represent saturated hydrocarbon chains. The carbon numbers mentioned above *m/z* values are those of the free MAs.

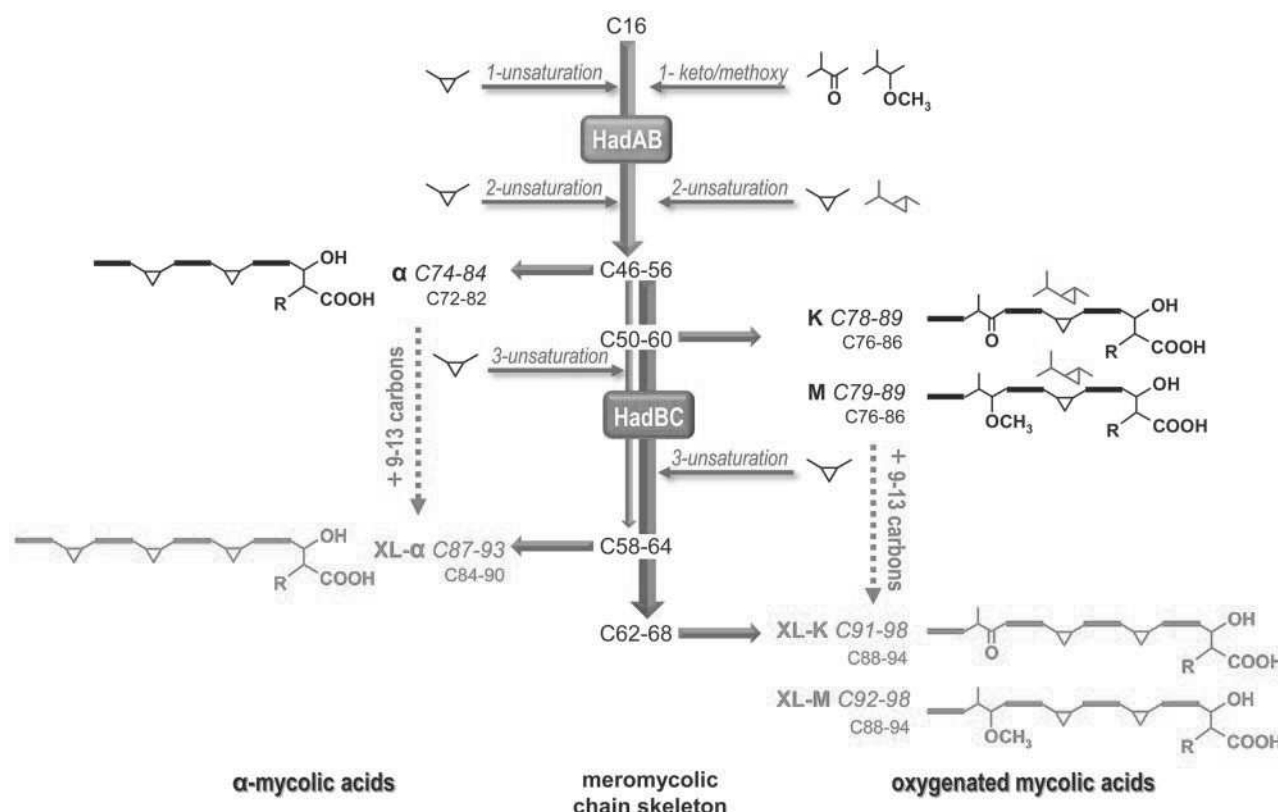
dicyclopropanated oxygenated MAs and tricyclopropanated  $\alpha$ -MAs (Table S3). Thus, an additional cyclopropane ring was incorporated into the meromycetic chain from a carbon skeleton length threshold of  $C_{62}$ – $C_{64}$  for oxygenated MAs and  $C_{58}$  for  $\alpha$ -MAs (Fig. 3, Fig. S5 and Table S3). Consistent with this, minor very high mass MAs bearing an additional cyclopropanated meromycetic segment have been reported in *Mtb* complex (Watanabe et al., 2001).

An *Mtb* H37Rv strain expressing the *hadC* gene under the control of a tetracycline-inducible promoter was constructed. When *hadC* was overexpressed, the XL-MAs were clearly detected in the total MA mix, whereas they were not visible in the absence of tetracycline, demonstrating the link between *hadC* expression and production of XL-MAs (Fig. S6). Thus, most methoxy- and keto-XL-MAs were undetectable in MA samples purified from the *hadC*-deficient strains *Mtb* H37Ra and H37Rv $\Delta$ *hadC* (Fig. 3, Fig. S5 and Table S3). The longest diunsaturated oxygenated MAs in *Mtb* H37Ra had 91–92 carbons and in *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC* 89–90 carbons, corresponding to sizes of meromycetic chain skeleton ( $C_{62}$ – $C_{64}$  and  $C_{60}$ – $C_{62}$  respectively) at the boundary between standard-sized MAs and XL-MAs (Fig. 3, Fig. S5 and Table S3). In contrast,  $\alpha$ -XL-MAs biosynthesis persisted partially in both H37Ra and H37Rv $\Delta$ *hadC* (Fig. S5 and Table S3). In the complemented strains, the production of oxygenated XL-MAs was recovered (Fig. 3, Fig. S5 and Table S3).

These data clearly demonstrate the involvement of the HadC subunit in the biosynthesis of an additional unsaturated segment of the meromycetic chain giving atypical extra-long  $C_{91}$ – $C_{98}$  methoxy- and keto-XL-MAs (Fig. 4). When HadBC enzyme is absent, the third function (unsaturation) that is usually introduced into meromycetic chain skeletons beyond  $C_{60}$  (Fig. 4) is probably integrated by default into available shorter substrates, the standard-sized meromycetic chains, resulting in the synthesis of anomalous standard-sized oxygenated MAs bearing two unsaturations. The production of such anomalous MAs among the  $\alpha$ -MAs in *hadC*-deficient strains implies that HadBC enzyme is also partially involved in the production of the  $\alpha$ -XL-MAs. The partial persistence of  $\alpha$ -XL-MAs biosynthesis, however, suggests that HadAB function (or a distinct unknown dehydratase function) partially overlaps that of HadBC and is sufficient to maintain a basal production in the absence of HadBC (Fig. 4). Indeed, the  $\alpha$ -XL-MAs are naturally shorter than the methoxy- and keto-XL-MAs, and the  $\alpha$ -meromycetic carbon skeleton ( $C_{58}$ – $C_{64}$ ) is four carbons shorter on average than that of the oxygenated meromycetic chains ( $C_{62}$ – $C_{68}$ ) (Fig. 4).

#### Effect of *hadC* mutation on the morphotype, biofilm growth, tolerance to stresses and virulence of *M. tuberculosis*

The H37Rv and H37Ra variants of isolate *Mtb* H37 were originally dissociated based on their distinct colony morphologies (Steenken et al., 1934; Steenken and Gardner, 1946). The colonies of *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC* were very small with a clear-cut periphery reminiscent of those of H37Ra (Fig. 5A). The colonies of wt H37Rv were much larger with a veil-like periphery, and both H37Ra/*hadC*<sub>Rv</sub> and H37Rv $\Delta$ *hadC*/*hadC*<sub>Rv</sub> complemented strains exhibited an



**Fig. 4.** Specific functions of HadAB and HadBC enzymes in mycolic acid biosynthesis.

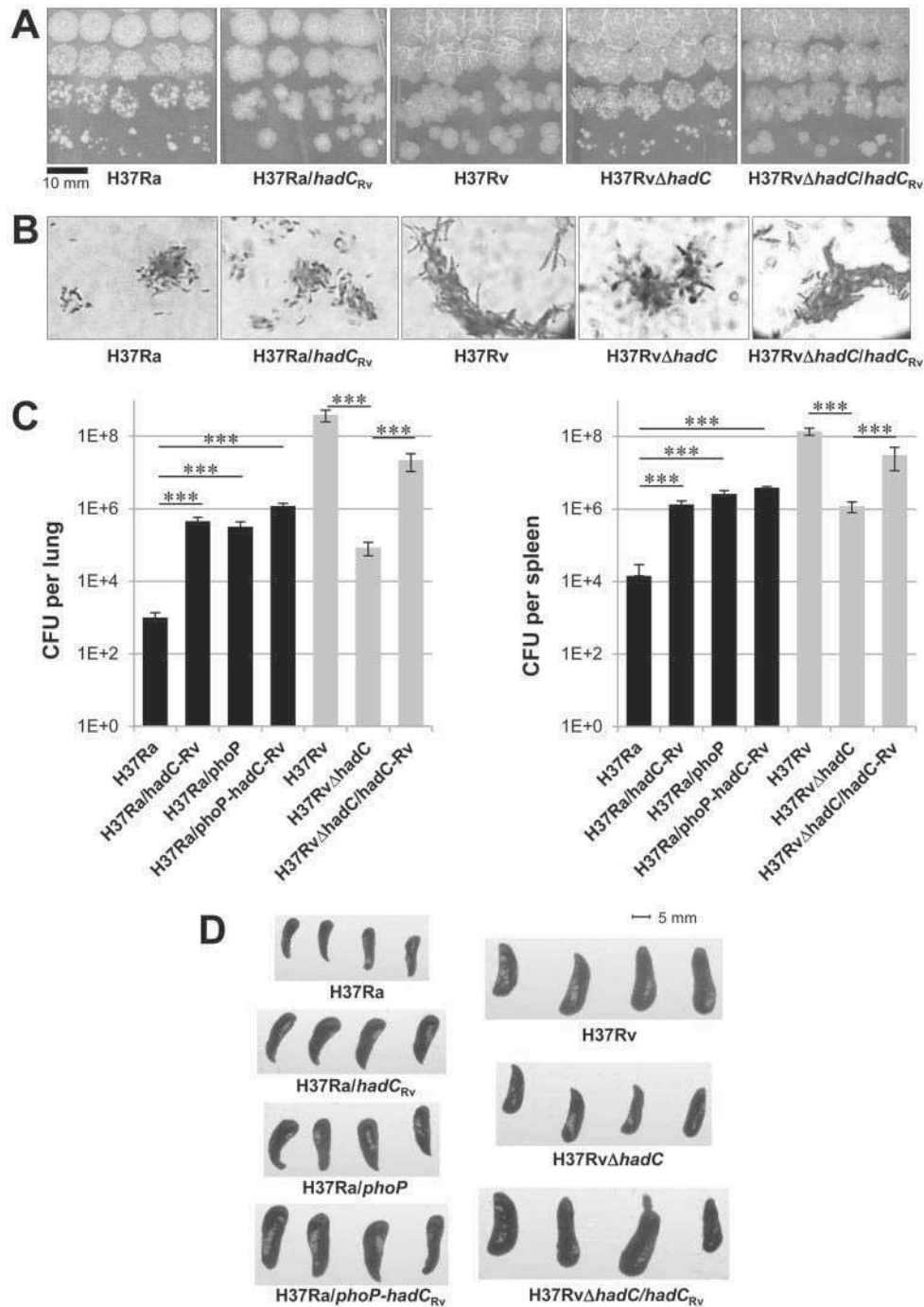
Our study shows that HadAB enzyme is dedicated to the early FAS-II elongation cycles (orange thick arrow; see also Fig. S1), during which two chemical functions would be incorporated, leading to the formation of standard-sized  $\alpha$ -meromycolic chains (C<sub>46</sub>–C<sub>56</sub> skeletons), precursors of the  $\alpha$ -mycolic acids. Part of these molecules are further elongated, mainly by HadBC enzyme (blue arrow), during late FAS-II elongation cycles to produce standard-sized oxygenated meromycolic chains (C<sub>50</sub>–C<sub>60</sub> skeletons), precursors of the keto- and methoxy-mycolic acids. Additionally, HadBC extends part of the meromycolic chains to generate a fourth cyclopropanated segment of 9–13 carbons, resulting in the synthesis of extra-long (XL)  $\alpha$ - and oxygenated meromycolic chains (C<sub>58</sub>–C<sub>64</sub> and C<sub>62</sub>–C<sub>68</sub> skeletons respectively). HadAB and HadBC activities would partially overlap. Thus, in *hadC*-deficient strains (*Mtb* H37Ra, *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC*), HadAB would partly take over HadBC function and catalyze part of the late elongation cycles (orange thin arrow), allowing the formation of reduced amounts of standard-sized oxygenated MAs and XL- $\alpha$ -MAs, although we cannot rule out that this is due to the intervention of another unknown dehydratase. In these mutant strains, HadAB is not able to generate the longer XL-keto/methoxy-meromycolic chains (C<sub>62</sub>–C<sub>68</sub> skeletons); the 3rd function (unsaturation) that is usually incorporated in the latter molecules is by default integrated in shorter available substrates (standard-sized meromycolic chains), resulting in the synthesis of anomalous standard-sized MAs bearing an additional unsaturation (cyclopropane or double bond) (see Fig. 2 and Fig. S3). Gray arrows represent the condensation step of the meromycolic chains with the C<sub>26</sub> saturated fatty acyl chain (see Fig. S1). The lengths of the carbon skeletons [omitting carbons of the methoxy group, methyl branch(es), and methylene of cyclopropane rings] are indicated in standard font based on molecules from *Mtb* H37Rv CIP 64.31. The total carbon numbers of the mycolic acids are specified in italic.

intermediate phenotype (Fig. 5A). Another characteristic of the virulent *Mtb* bacilli is their capacity to aggregate into cord-like structures during growth in culture (Middlebrook *et al.*, 1947) (Fig. 5B). In contrast, the avirulent variant *Mtb* H37Ra has never been observed to form cords under any condition of growth (Middlebrook *et al.*, 1947). Like H37Ra, *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC* had lost the ability to form cords (Fig. 5B). Complementation with a wt *hadC*<sub>Rv</sub> copy partially restored the cording phenotype to the deletion mutant but not to *Mtb* H37Ra (Fig. 5B), suggesting that H37Ra carries additional mutations preventing restoration of cording. *HadC* deficiency had also an impact on the bacterial growth as a pellicle. The biofilm had a reduced

thickness and displayed a different aspect in *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC* mutant relative to H37Rv wt and to the complemented strain H37Rv $\Delta$ *hadC*/*hadC*<sub>Rv</sub> (Fig. S7A).

We then measured the impact of *hadC* inactivation on the sensitivity to a detergent, SDS, and to various antibiotics: three first-line TB drugs, rifampicin, isoniazid and ethambutol, and a broad spectrum fluoroquinolone, ciprofloxacin. As shown in Table 2, *Mtb* H37Rv $\Delta$ *hadC* strain was more sensitive than the wt strain to several of these molecules and specially to rifampicin, suggesting a significant effect of *hadC* deletion on the envelope integrity.

To investigate the consequences of *hadC* deficiency for virulence, the multiplication of the complemented *Mtb*



**Fig. 5.** Impact of *hadC* mutation on the colony morphotype, cording and virulence of *M. tuberculosis*.

*HadC* mutation (*Mtb* H37Ra) or deletion (*Mtb* H37RvΔ*hadC*) induces a change in the colony morphology, a loss of the cording phenotype (bacterial aggregation into cord-like structures) and a marked loss of virulence relative to wt *Mtb* (H37Rv).

**A.** Colony morphology. Serial dilutions were spotted on Middlebrook 7H11 agar supplemented with OADC and grown for 2 weeks.

**B.** Cording. Ziehl-Neelsen stain of culture aliquots after 7 day growth in Middlebrook 7H9 broth supplemented with ADC. Magnification ×1000.

**C.** Virulence. Bacterial loads in lungs (left panel) and spleens (right panel) of SCID mice were determined 21 days after intravenous infection with  $1 \times 10^5$  cfu (*Mtb* H37Ra/hadC<sub>Rv</sub>, H37Rv, H37RvΔ*hadC*, H37RvΔ*hadC*/hadC<sub>Rv</sub>),  $1.3 \times 10^5$  cfu (*Mtb* H37Ra),  $1.7 \times 10^5$  cfu (*Mtb* H37Ra/phoP-hadC<sub>Rv</sub>) or  $2 \times 10^5$  cfu (*Mtb* H37Ra/phoP). Data reported are mean and standard deviation of values obtained in a representative experiment of three performed each with four mice per group. Significant statistical differences in CFU values obtained from mice infected with *Mtb* H37Ra versus H37Ra complemented by *hadC* and/or *phoP* from *Mtb* H37Rv, as well as from mice infected with *Mtb* H37RvΔ*hadC* versus H37Rv wt or *Mtb* H37RvΔ*hadC*/hadC<sub>Rv</sub> strains are reported (\*\*\*,  $P < 0.001$ ).

**D.** Photographs of the spleens from mice infected by the different *Mtb* strains.

**Table 2.** Impact of *hadC* deletion on the sensitivity of *M. tuberculosis* to antibiotics and SDS.

Strain	Minimal inhibitory concentration <sup>a</sup>				
	Rifampicin (µg/ml)	Isoniazid (µg/ml)	Ethambutol (µg/ml)	Ciprofloxacin (µg/ml)	SDS (%)
H37Rv	1.2	0.16	6.2	0.83	0.010
H37RvΔ <i>hadC</i>	<0.01	0.04	6.2	0.83	0.003
H37RvΔ <i>hadC</i> / <i>hadC</i> <sub>H37Rv</sub>	1.2	0.08	6.2	0.83	0.010

a. MIC values measured by MTT assays were determined as the lowest concentration of compound yielding 100% inhibition of the bacterial growth.

H37Ra/*hadC*<sub>H37Rv</sub> strain was compared with that of *Mtb* H37Ra wt in a mouse model of infection. Interestingly, the presence of the wt *hadC* allele from H37Rv induced a significant (about 2 logs) and reproducible increase of the bacterial load both in the lung and spleen of SCID mice (Fig. 5C). This was also reflected in an increase of the size of spleens (Fig. 5D). As expected, the level of virulence of the complemented H37Ra strain did not reach that of the reference strain H37Rv. Nevertheless, the impact of the wt *hadC*<sub>H37Rv</sub> gene on H37Ra virulence was comparable to that of the wt *phoP* allele of *Mtb* H37Rv used as a positive control (Fig. 5C) (Frigui *et al.*, 2008). Even more strikingly, the deletion of the *hadC* gene in *Mtb* H37Rv induced a dramatic 4 log-drop of CFU counts in the lungs and a substantial decrease in the spleens of mice (Fig. 5C); this was associated with reduced spleen size (Fig. 5D). This phenomenon likely reflected a specific *in vivo* phenotype since the mutant and the wt strains displayed similar multiplication rates in axenic cultures (Fig. S7B). The level of virulence of the *Mtb* H37RvΔ*hadC* mutant was close to that of *Mtb* H37Ra/*phoP* strain (Fig. 5C). Nonetheless, transformation of H37Ra by both wt *phoP* and *hadC*<sub>H37Rv</sub> genes simultaneously did not restore virulence to the level of *Mtb* H37Rv (Fig. 5C), plausibly because of additional attenuating factors in H37Ra, such as the absence of phthiocerol dimycocerosates (Chesne-Seck *et al.*, 2008). However, the partial complementation observed upon transformation of *Mtb* H37RvΔ*hadC* with a wt *hadC*<sub>H37Rv</sub> copy provides explicit evidence for a link between HadBC functions and virulence (Fig. 5C).

In conclusion, these data show that the *hadC* mutation in strain *Mtb* H37Ra makes a major contribution to the attenuation of this widely used laboratory isolate. More generally, they highlight the involvement of HadBC enzyme in the virulence of *Mtb*.

## Discussion

Comparison of virulent and avirulent isogenic strains is a powerful approach to improving our knowledge of the molecular mechanisms involved in the pathogenicity of the

tubercle bacillus. Starting from information about a genomic polymorphism in the *hadC* gene of *Mtb* H37Ra, we demonstrate that the lack of active HadBC enzyme causes major changes in the distribution and fine structures of *Mtb* MAs. In particular, we describe a substantial reduction in the oxygenated MA content and the absence of *trans*-cyclopropane rings in the meromycolic chains. Importantly, the phenotype is reminiscent of a *Mtb kasB* mutant, which lacks the condensing enzyme KasB that synthesizes the 3-ketoacyl-ACP intermediates during late FAS-II elongation cycles (Fig. S1) (Bhatt *et al.*, 2007). The findings we report here reveal that the HadBC heterodimer is involved in the formation of C<sub>50</sub>–C<sub>60</sub> long meromycolic chain skeletons used for the biosynthesis of the oxygenated MAs (Fig. 4). The incapacity of CmaA2 methyltransferase to introduce *trans*-cyclopropane rings into these meromycolic chains in *hadC*- and *kasB*-deficient strains is most likely due to the loss of interactions between CmaA2 and the FAS-II system via HadBC and KasB (Bhatt *et al.*, 2007). Indeed, the existence of interactions between CmaA2 and the latter enzymes has been reported (Cantaloube *et al.*, 2011). However, there are important phenotypic differences between the *kasB* mutant and *hadC*-deficient strains, notably the production of α-, methoxy- and keto-MAs of standard sizes with an abnormal degree of unsaturation in the *hadC* mutants. Our study provides evidence that the HadBC enzyme is also responsible for the biosynthesis of atypical extra-long MAs bearing an additional unsaturated C<sub>9</sub>–C<sub>13</sub> segment (Fig. 4), naturally present in the tubercle bacillus and other mycobacteria, and in the *Segniliparus* genus (Watanabe *et al.*, 2001; Lanéelle *et al.*, 2013). The absence of HadBC results in the synthesis of anomalous MAs bearing an additional unsaturation. In the absence of HadBC, the third function (cyclopropane or double bond) usually introduced into the extra-long meromycolic chains might be integrated by default into available shorter substrates, standard-sized meromycolic chains.

Mycolic acids play a pivotal role in the organization of the mycobacterial envelope that constitutes a highly efficient permeability barrier (Liu *et al.*, 1996; Daffé and Draper, 1998). Their structural modifications affect the

physical properties of the mycomembrane. First, *trans*-cyclopropanes cause a decrease in the cell wall fluidity (Liu *et al.*, 1996); they facilitate the folding of the oxygenated MAs into W-form conformations with the four hydrocarbon chains in parallel, allowing tight packing of the MAs in *Mtb* H37Rv (Villeneuve *et al.*, 2013). Consistent with this, the absence of *trans*-cyclopropane rings prevents the oxygenated MAs of *Mtb* H37Ra from adopting stable fully folded W-form conformations (Villeneuve *et al.*, 2013). Second, the overall MA chain length is also a major determinant of cell wall fluidity, longer molecules being associated with lower fluidity (Liu *et al.*, 1996). Thus, the presence of extra-long MAs in wt *Mtb* might be an additional factor contributing to the extremely low permeability of its mycomembrane. The XL-MAs may potentially adopt a 'tripleU-form' conformation where the additional segment of the meromycolic chain folds parallel to the other hydrocarbon chains, facilitating MA packing. Therefore, the loss of the oxygenated XL-MAs observed in *Mtb* *hadC* mutants may also affect the permeability of their cell envelope. The higher sensitivity of H37RvΔ*hadC* to diverse compounds, and particularly to rifampicin, a large lipophilic molecule, as well as the reduced acid-fastness of *Mtb* H37Ra strain (Middlebrook *et al.*, 1947) triggered by multiple mycolic acid structural changes most likely reflect a disruption in the organization of the mycomembrane, which acts as an hydrophobic permeability barrier and contributes to the intrinsic resistance of mycobacteria to hydrophobic drugs (Liu *et al.*, 1996).

Integration of a wt *hadC*<sub>Rv</sub> copy into *Mtb* H37Ra significantly increased its virulence in SCID mice, whereas the deletion of the *hadC* gene from *Mtb* H37Rv significantly reduced virulence and affected its morphology and its capacities to form cords and biofilms. We used the bacterial load in organs of SCID mice as a readout of virulence, as this murine model provides a rapid and sensitive method for evaluating *in vivo* growth characteristics of mycobacterial strains during the acute phase of infection, appropriate for low virulent strains such as *Mtb* H37Ra or other attenuated strains (Pym *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2003; Frigui *et al.*, 2008; Bottai *et al.*, 2011). Consistent with our findings, the fine structures of the mycolic acids are known to affect the virulence level of *Mtb* (Dubnau *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2006). They also contribute to determining the colony morphology and the abilities of *Mtb* to develop biofilms or to aggregate in planktonic cultures as cord structures important for virulence (Hunter *et al.*, 2006; Glickman, 2008; Ojha *et al.*, 2008; Sambandan *et al.*, 2013). In particular, oxygenated free mycolic acids, whose content is greatly reduced in the *hadC* mutants, are essential to biofilm growth (Ojha *et al.*, 2008; Sambandan *et al.*, 2013). They were also described as key factors of *Mtb* virulence (Dubnau *et al.*, 2000), playing a role in the selective repression of macrophage IL-12p40 cytokine produc-

tion aimed to evade elimination by the host immune system (Dao *et al.*, 2008). From our observations, we conclude that the insertion mutation in *hadC* of *Mtb* H37Ra is partly responsible for the loss of both virulence and cording morphology of this strain, as consequences of the profound changes in the distribution and fine structure of the mycolic acids. This might act at two different levels: (i) the molecular arrangement and fluidity of the mycomembrane (see above) and (ii) the biological activities of the mycolate-containing compounds that are pathogenicity factors. Indeed, it is known that subtle changes to the fine structure of the mycoloyl chains, affecting chain length or the nature of the chemical functions, can have large effects on their biological activities (Vander Beken *et al.*, 2011; Verschoor *et al.*, 2012).

Finally, our findings also may be relevant to drug development (Le Chevalier *et al.*, 2014). Several new compounds discovered in this post TB genomic era through target-based screening focusing on MA metabolism are very promising as TB therapeutics (North *et al.*, 2014). HadBC, unlike the other known bacterial (3*R*)-hydroxyacyl-ACP dehydratases, belongs to the hydratase 2 enzyme family (Sacco *et al.*, 2007) and metabolizes extremely long chain substrates (Fig. 4). Moreover, it has been recently shown that isoxyl and thiacetazone TB drugs both target the dehydration step of the FAS-II system triggering the inhibition of the MA biosynthesis pathway. In particular, overexpression of *hadBC* or the presence of point mutations in *hadC* confer resistance to these drugs (Belardinelli and Morbidoni, 2012; Grzegorzewicz *et al.*, 2012; Gannoun-Zaki *et al.*, 2013), strongly suggesting that HadBC is a vulnerable and druggable enzyme. Its singularity and the role it plays in *Mtb* virulence, as demonstrated here, make HadBC an attractive target for therapeutic purposes.

## Experimental procedures

### Sequence analyses and sequencing

Bioinformatic analysis of *Mtb* H37Ra genome [NC\_009525 (Zheng *et al.*, 2008)] was performed by BlastP alignment (Altschul *et al.*, 1997) using genes of *Mtb* H37Rv [TubercuList Web server (Lew *et al.*, 2011)] as probes. DNA sequencing was carried out (Millegen, Toulouse, France) with Big Dye Terminator Chemistry V3.1 on a 3130XL capillary automated sequencing system (Applied Biosystems). Alignments were performed using the software Clone Manager 9 (Windows) and shaped using Boxshade version 3.21 software.

### Cultures

For biofilm growth and MA extractions, *Mtb* strains were grown as pellicles in Middlebrook 7H9 broth (Difco) supplemented with 0.2% glycerol, 10% albumin-dextrose-catalase (ADC)

(Difco) and the required antibiotics in glass bottles for 5 weeks. Planktonic cultures were performed with shaking in Middlebrook 7H9 medium (Difco) containing 0.05% Tween 80, 0.2% glycerol plus 10% ADC (Difco) and the required antibiotics. Planktonic growth kinetics were undertaken in 17 ml tubes. For solid medium, Middlebrook 7H11 containing 0.5% glycerol and 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC) (Difco) was used with the required antibiotics. Antibiotic concentrations used were as follow: 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  hygromycin, 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamycin, 20  $\text{ng ml}^{-1}$  tetracyclin, 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  zeocin. For *E. coli* growth, Luria–Bertani medium was used with antibiotics when required (40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamycin, 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  hygromycin). All cultures were incubated at 37°C.

#### Construction of the deletion mutants and complemented strains

See also Supporting Experimental Procedures. *Mtb* H37Rv $\Delta$ hadC and H37Ra $\Delta$ hadC mutants were generated from *Mtb* H37Rv CIP 64.31 (ATCC 27294) and H37Ra strain CIP 103471 (ATCC 25177) (Collection Institut Pasteur, Paris, France) respectively, with the recombineering system as described (van Kessel and Hatfull, 2007). The replacement of the target gene by the zeocin resistance cassette and the absence of any wt allele copy as well as of any major rearrangement in the region were checked by PCR. For complementation and overexpression experiments, *Mtb* H37Ra, *Mtb* H37Rv and *Mtb* H37Rv $\Delta$ hadC were transformed by plasmids carrying *Rv0637* or *phoP* gene from *Mtb* H37Rv or *MRA0648* gene from *Mtb* H37Ra and constructed as described in Supporting Experimental Procedures.

#### Mycolic acid extraction and quantification

MAs were extracted from the different strains as previously described (Lanéelle *et al.*, 2012), dried and weighted. The dry weights of MAs were normalized by the dry weights of the bacterial residues. MAs were methylated with diazomethane and the resulting MAMEs were purified by preparative TLC on silica gel 60 (Macherey-Nagel) developed with petroleum ether/diethylether (9:1, v/v, five runs). The relative abundances of the different MA classes were determined by loading a fixed amount (10  $\mu\text{g}$ ) of MA mixture onto a TLC silica gel 60 plate (Merck) developed in petroleum ether/diethylether (9:1, v/v, five runs) and stained by immersion in 0.01% primuline (in acetone:water, 8:2). The intensity of each spot was measured by fluorescence at 370 nm.

#### Argentation TLC analysis

To search for the presence of ethylenic compounds, purified mycolate fractions were resolved on AgNO<sub>3</sub>-impregnated silica HPTLC plates developed with petroleum ether:diethylether (7:3, v/v, two runs). The cleavage of ethylenic MAMEs was performed by permanganate-periodate oxidation (von Rudloff, 1956) at 30°C in tertiary butanol as solvent. The acids obtained from the oxidative cleavages were methylated and purified on preparative TLC with dichloromethane as eluent.

#### MALDI-TOF MS and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy

MALDI-MS detection of purified samples in reflectron mode was performed on a 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Voyager DE-STR, Framingham, MA) equipped with an Nd:YAG laser (355 nm) operating by pulses of 500 ps with a frequency of 200 Hz. Two thousand five hundred shots were accumulated in positive ion mode, and MS data were acquired using the instrument default calibration. Mycolate samples were dissolved in chloroform, at the concentration of 1 mM, and were directly spotted onto the target plate as 0.5  $\mu\text{l}$  droplets, followed by the addition of 0.5  $\mu\text{l}$  of matrix solution: 2,5-dihydroxybenzoic acid (10  $\text{mg ml}^{-1}$ ) in CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:1, v/v). Samples were allowed to crystallize at room temperature. <sup>1</sup>H-NMR spectra of purified samples were obtained in CDCl<sub>3</sub> (99.9% D) at 298 K using a Bruker AVANCE 600 MHz spectrometer (Bruker Biospin) equipped with a 5 mm cryoprobe TCI. Chemical shifts values (in ppm) were relative to the internal CHCl<sub>3</sub> resonance (at 7.26 ppm).

#### Mouse infection experiments

Virulence studies were performed in severe combined immune-deficient (SCID) mice. Briefly, groups of 6 week old C.B-17/lcr SCID mice (Charles River) were intravenously infected with a bacterial suspension containing 1–2  $\times 10^5$  CFU/mouse. Three weeks after infection, mice were euthanized, and spleen and lungs were homogenized in 2 ml tubes containing 500  $\mu\text{l}$  Sauton medium and 2.5 mm diameter glass beads using an MM300 apparatus (Qiagen). CFU numbers in target organs were determined by plating 5- or 10-fold serial dilutions of organ homogenates on solid medium and incubation at 37°C. Statistical differences in bacterial loads were determined by ANOVA test with Tukey correction, after conversion of CFU numbers in Log10 CFU values. Statistical significance was considered to be a *P* value  $\leq 0.05$ . These studies were approved by the Institut Pasteur Safety Committee (Protocol 11.245; experimentation authorization number 75–1469), in accordance with European and French guidelines (Directive 86/609/CEE and Decree 87–848 of 19 October 1987), and implicating approval from local ethical committees (CETEA 2013-0036). All animals were observed daily and were weighed once a week in compliance with ethical requirements and to monitor any adverse effects possibly related to the infection.

#### Colony morphology and cording analyses

For the analysis of the colony morphologies, serial dilutions of a liquid culture of each strain were spotted onto Middlebrook 7H11 agar supplemented with 0.5% glycerol and 10% OADC, and grown for 2 weeks. For cording analysis, the strains were grown for 7 days in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 0.5% glycerol and 10% ADC and stained following the Ziehl–Neelsen procedure (Allen, 1992).

#### Evaluation of *Mtb* sensitivity to diverse molecules

The sensitivity levels of *Mtb* strains to antibiotics and SDS were evaluated by determining the minimum inhibitory concentrations (MICs), using a colorimetric microassay



based on the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) to formazan by metabolically active cells, as described (Vaubourgeix *et al.*, 2009).

## Acknowledgements

We wish to thank Lucie Spina and Dr. Emilie Huc for their help during some MS analyses, Wladimir Malaga for the generous gift of modified versions of plasmids pMV361 and pJV53, Fabien Le Chevalier for help with bacterial staining and Dr. Marie-Antoinette Lan  lle for helpful discussions. The NMR data were collected on the PICT-IbISA facility; NMR experiments were performed on the PICT-Genotoul platform of Toulouse funded by CNRS, Université de Toulouse-UPS, Ibisa, European structural funds and the Midi-Pyr  n  es region. This study was supported by grants from the European Union (LSHP-CT-2005-018923 and 260872), the EU-EFPIA Innovative Medicines Initiative (grant agreement 115337), the Agence Nationale de la Recherche (FASMY, grant ANR-14-CE16-0012). RB acknowledges support by the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20130326471). The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

- Allen, J.L. (1992) A modified Ziehl-Neelsen stain for Mycobacteria. *Med Lab Sci* **49**: 99–102.
- Alsaadi, A.I., and Smith, D.W. (1973) The fate of virulent and attenuated Mycobacteria in guinea pigs infected by the respiratory route. *Am Rev Respir Dis* **107**: 1041–1046.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., *et al.* (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Belardinelli, J.M., and Morbidoni, H.R. (2012) Mutations in the essential FAS II beta-hydroxyacyl ACP dehydratase complex confer resistance to thiacetazone in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium kansasii*. *Mol Microbiol* **86**: 568–579.
- Bhatt, A., Fujiwara, N., Bhatt, K., Gurcha, S.S., Kremer, L., Chen, B., *et al.* (2007) Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 5157–5162.
- Boritsch, E.C., Supply, P., Honore, N., Seeman, T., Stinear, T.P., and Brosch, R. (2014) A glimpse into the past and predictions for the future: the molecular evolution of the tuberculosis agent. *Mol Microbiol* **93**: 835–852.
- Bottai, D., Majlessi, L., Simeone, R., Frigui, W., Laurent, C., Lenormand, P., *et al.* (2011) ESAT-6 secretion-independent impact of ESX-1 genes *espF* and *espG1* on virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **203**: 1155–1164.
- Brosch, R., Philipp, W.J., Stavropoulos, E., Colston, M.J., Cole, S.T., and Gordon, S.V. (1999) Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the attenuated *M. tuberculosis* H37Ra strain. *Infect Immun* **67**: 5768–5774.
- Cantaloube, S., Veyron-Churlet, R., Haddache, N., Daffe, M., and Zerbib, D. (2011) The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II dehydratases and methyltransferases define the specificity of the mycolic acid elongation complexes. *PLoS ONE* **6**: e29564.
- Chesne-Seck, M.L., Barilone, N., Boudou, F., Gonzalo Asensio, J., Kolattukudy, P.E., Martin, C., *et al.* (2008) A point mutation in the two-component regulator PhoP-PhoR accounts for the absence of polyketide-derived acyltrehaloses but not that of phthiocerol dimycocerosates in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J Bacteriol* **190**: 1329–1334.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., *et al.* (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537–544.
- Daff  , M., and Draper, P. (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**: 131–203.
- Dao, D.N., Sweeney, K., Hsu, T., Gurcha, S.S., Nascimento, I.P., Roshevsky, D., *et al.* (2008) Mycolic acid modification by the *mmaA4* gene of *M. tuberculosis* modulates IL-12 production. *PLoS Pathog* **4**: e1000081.
- Davidson, L.A., Draper, P., and Minnikin, D.E. (1982) Studies on the mycolic acids from the walls of *Mycobacterium microti*. *J Gen Microbiol* **128**: 823–828.
- Dinadayala, P., Laval, F., Raynaud, C., Lemassu, A., Laneelle, M.A., Laneelle, G., *et al.* (2003) Tracking the putative biosynthetic precursors of oxygenated mycolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Structural analysis of fatty acids of a mutant strain devoid of methoxy- and ketomycolates. *J Biol Chem* **278**: 7310–7319.
- Dubnau, E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V.P., Laneelle, M.A., Yu, K., *et al.* (2000) Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol Microbiol* **36**: 630–637.
- Frigui, W., Bottai, D., Majlessi, L., Monot, M., Josselin, E., Brodin, P., *et al.* (2008) Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP. *PLoS Pathog* **4**: e33.
- Gannoun-Zaki, L., Alibaud, L., and Kremer, L. (2013) Point mutations within the fatty acid synthase type II dehydratase components HadA or HadC contribute to isoxyl resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 629–632.
- Gao, Q., Kripke, K., Arinc, Z., Voskuil, M., and Small, P. (2004) Comparative expression studies of a complex phenotype: cord formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **84**: 188–196.
- Gebhardt, H., Meniche, X., Tropis, M., Kramer, R., Daffe, M., and Morbach, S. (2007) The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in Corynebacterineae. *Microbiology* **153**: 1424–1434.
- Glickman, M.S. (2008) Cording, cord factors, and trehalose dimycolate. In *The mycobacterial cell envelope*. Daff  , M., and Reyrat, J.-M. (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 63–73.
- Grzegorzewicz, A.E., Kordulakova, J., Jones, V., Born, S.E., Belardinelli, J.M., Vaqu  , A., *et al.* (2012) A common mechanism of inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid biosynthetic pathway by isoxyl and thiacetazone. *J Biol Chem* **287**: 38434–38441.
- Hotter, G.S., Wards, B.J., Mouat, P., Besra, G.S., Gomes, J.,

- Singh, M., *et al.* (2005) Transposon mutagenesis of Mb0100 at the ppe1-nrp locus in *Mycobacterium bovis* disrupts phthiocerol dimycocerosate (PDIM) and glycosylphenol-PDIM biosynthesis, producing an avirulent strain with vaccine properties at least equal to those of *M. bovis* BCG. *J Bacteriol* **187**: 2267–2277.
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S.M., Chen, B., Chen, M., Dai, A.Z., Morin, P.M., *et al.* (2003) The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 12420–12425.
- Hunter, R.L., Venkataprasad, N., and Olsen, M.R. (2006) The role of trehalose dimycolate (cord factor) on morphology of virulent *M. tuberculosis* in vitro. *Tuberculosis (Edinb)* **86**: 349–356.
- van Kessel, J.C., and Hatfull, G.F. (2007) Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods* **4**: 147–152.
- Lanéelle, M.A., Eynard, N., Spina, L., Lemassu, A., Laval, F., Huc, E., *et al.* (2013) Structural elucidation and genomic scrutiny of the C60 to C100 mycolic acids of *Segniliparus rotundus*. *Microbiology* **159**: 191–203.
- Lanéelle, M.A., Launay, A., Spina, L., Marrakchi, H., Laval, F., Eynard, N., *et al.* (2012) A novel mycolic acid species defines two novel genera of the Actinobacteria, Hoyosella and Amycolicococcus. *Microbiology* **158**: 843–855.
- Larson, C.L., and Wicht, W.C. (1964) Infection of mice with *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37ra. *Am Rev Respir Dis* **90**: 742–748.
- Le Chevalier, F., Cascioferro, A., Majlessi, L., Herrmann, J.L., and Brosch, R. (2014) *Mycobacterium tuberculosis* evolutionary pathogenesis and its putative impact on drug development. *Future Microbiol* **9**: 969–985.
- Lee, J.S., Krause, R., Schreiber, J., Mollenkopf, H.J., Kowall, J., Stein, R., *et al.* (2008) Mutation in the transcriptional regulator PhoP contributes to avirulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain. *Cell Host Microbe* **3**: 97–103.
- Lew, J.M., Kapopoulou, A., Jones, L.M., and Cole, S.T. (2011) TubercuList – 10 years after. *Tuberculosis (Edinb)* **91**: 1–7.
- Liu, J., Barry, C.E., 3rd, Besra, G.S., and Nikaïdo, H. (1996) Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem* **271**: 29545–29551.
- McDonough, K.A., Kress, Y., and Bloom, B.R. (1993) Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun* **61**: 2763–2773.
- Marrakchi, H., Lanéelle, M.A., and Daffe, M. (2014) Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem Biol* **21**: 67–85.
- Middlebrook, G., Dubos, R.J., and Pierce, C. (1947) Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J Exp Med* **86**: 175–184.
- Mostowy, S., Cleto, C., Sherman, D.R., and Behr, M.A. (2004) The *Mycobacterium tuberculosis* complex transcriptome of attenuation. *Tuberculosis (Edinb)* **84**: 197–204.
- North, E.J., Jackson, M., and Lee, R.E. (2014) New approaches to target the mycolic acid biosynthesis pathway for the development of tuberculosis therapeutics. *Curr Pharm Des* **20**: 4357–4378.
- Ojha, A.K., Baughn, A.D., Sambandan, D., Hsu, T., Trivelli, X., Guerardel, Y., *et al.* (2008) Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol* **69**: 164–174.
- Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M., and Cole, S.T. (2002) Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* **46**: 709–717.
- Rao, V., Gao, F., Chen, B., Jacobs, W.R., Jr, and Glickman, M.S. (2006) Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses *Mycobacterium tuberculosis*-induced inflammation and virulence. *J Clin Invest* **116**: 1660–1667.
- Riley, L.W. (2006) Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J Clin Invest* **116**: 1475–1478.
- Rindi, L., Lari, N., and Garzelli, C. (1999) Search for genes potentially involved in *Mycobacterium tuberculosis* virulence by mRNA differential display. *Biochem Biophys Res Commun* **258**: 94–101.
- von Rudloff, E. (1956) Periodate-permanganate oxidations. V. Oxidation of lipids in media containing organic solvents. *Can J Chem* **34**: 1413–1418.
- Sacco, E., Covarrubias, A.S., O'Hare, H.M., Carroll, P., Eynard, N., Jones, T.A., *et al.* (2007) The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 14628–14633.
- Sambandan, D., Dao, D.N., Weinrick, B.C., Vilcheze, C., Gurucha, S.S., Ojha, A., *et al.* (2013) Keto-mycolic acid-dependent pellicle formation confers tolerance to drug-sensitive *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* **4**: e00222–13.
- Steenken, W., Oatway, W.H., and Petroff, S.A. (1934) Biological studies of the tubercle bacillus: III. Dissociation and pathogenicity of the R and S variants of the human tubercle bacillus (H37). *J Exp Med* **60**: 515–540.
- Steenken, W., Jr, and Gardner, L.U. (1946) History of H37 strain of tubercle bacillus. *Am Rev Tuberc* **54**: 62–66.
- Supply, P., Marceau, M., Mangenot, S., Roche, D., Rouanet, C., Khanna, V., *et al.* (2013) Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Genet* **45**: 172–179.
- Vander Beken, S., Al Dulayymi, J.R., Naessens, T., Koza, G., Maza-Iglesias, M., Rowles, R., *et al.* (2011) Molecular structure of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern. *Eur J Immunol* **41**: 450–460.
- Vaubourgeix, J., Bardou, F., Boissier, F., Julien, S., Constant, P., Ploux, O., *et al.* (2009) S-adenosyl-N-decyl-aminoethyl, a potent bisubstrate inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid methyltransferases. *J Biol Chem* **284**: 19321–19330.
- Verschoor, J.A., Baird, M.S., and Grooten, J. (2012) Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of *Mycobacterium tuberculosis*. *Prog Lipid Res* **51**: 325–339.
- Villeneuve, M., Kawai, M., Horiuchi, K., Watanabe, M., Aoyagi, Y., Hitotsuyanagi, Y., *et al.* (2013) Conformational folding of mycobacterial methoxy- and ketomycolic acids facilitated by alpha-methyl trans-cyclopropane groups rather than cis-cyclopropane units. *Microbiology* **159**: 2405–2415.

- Wang, F., Langley, R., Gulten, G., Wang, L., and Sacchettini, J.C. (2007) Identification of a type III thioesterase reveals the function of an operon crucial for Mtb virulence. *Chem Biol* **14**: 543–551.
- Watanabe, M., Aoyagi, Y., Ridell, M., and Minnikin, D.E. (2001) Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria. *Microbiology* **147**: 1825–1837.
- WHO (2014) *Global tuberculosis report 2014*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

- Zheng, H., Lu, L., Wang, B., Pu, S., Zhang, X., Zhu, G., *et al.* (2008) Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS ONE* **3**: e2375.

### Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

## II. Expression, régulation et évolution des gènes *hadABC* chez *M.tuberculosis*

### A. Résumé d'article

*Jamet et al (p.72)*

Comme nous l'avons vu, plusieurs études montrent que les mycobactéries sont capables d'ajuster la quantité et structure des AMs de la mycomembrane en fonction des conditions environnementales, dont notamment lors de l'adaptation de *M.tb* à la vie intra-macrophagique [voir Introduction§ IV, G, a)]. S'il est clair que la biosynthèse des AMs est régulée, en revanche les données concernant les acteurs moléculaires permettant cette régulation, ainsi que les stimuli affectant l'expression des gènes de biosynthèse des AMs ou l'activité des différentes enzymes, sont encore très parcellaires [voir Introduction§ IV, G].

Les travaux présentés dans les deux articles précédents ont disséqué le rôle respectif des sous-unités des déshydratases HadABC dans la biosynthèse des AMs *in vivo*, et souligné l'importance de ces enzymes dans le maintien de la perméabilité de l'enveloppe, dans la susceptibilité aux antibiotiques, dans l'adaptation au stress mais aussi dans la virulence. Afin de comprendre la raison de cette importance dans la physiologie et la capacité adaptative de la bactérie, il était nécessaire de compléter ces observations par une étude intégrée et dynamique de l'expression et régulation gènes *hadABC*. Pour cela, nous avons essayé de rationaliser l'organisation génétique du locus contenant les gènes *hadABC* de *M.tb* et de comprendre comment cette organisation a été construite, voire sélectionnée, au cours de l'évolution. Parallèlement, nous avons testé expérimentalement certaines informations issues de cette analyse génomique.

Les gènes *hadABC* sont insérés au milieu de gènes impliqués dans le processus de traduction et à proximité de quatre gènes, *mmaA1-4*, codant pour quatre MTs responsables de la modification de la chaîne méromycolique. L'analyse comparative de cette région à l'intérieur des actinobactéries a révélé une grande plasticité de cette région, suggérant que celle-ci est un site préférentiel de recombinaison. Cependant, dans le même temps, cette analyse a suggéré que l'organisation chez *M.tb* est la conséquence d'une sélection fonctionnelle, permettant d'une part, une co-régulation des gènes *hadABC* avec des gènes du processus de traduction et d'autre part, de favoriser une interaction physique et fonctionnelle entre les sous-unités des déshydratases HadABC et les MTs MmaA1-4. Cette dernière



observation appuie donc le modèle selon lequel l'introduction des groupements fonctionnels aurait lieu pendant l'élongation de la chaîne méromycolique par FAS-II par opposition au modèle suggérant que cette modification aurait lieu post-FAS-II. Pour tester expérimentalement la co-expression, j'ai analysé le profil d'expression des gènes *hadABC*. En accord avec l'organisation génétique, j'ai ainsi identifié quatre promoteurs permettant de co-exprimer les gènes *hadABC* avec trois gènes du processus de traduction et un 5<sup>ème</sup> uniquement l'opéron *hadABC*. De manière cohérente avec le fait que chez tous les microorganismes le potentiel de traduction est contrôlé par la disponibilité en nutriments, j'ai montré que les gènes *hadABC* étaient co-régulés négativement avec les trois gènes du processus de traduction suite à une carence en nutriments et ceci partiellement à travers la réponse stringente (RS). Pour avoir une vision intégrée, j'ai élargi l'analyse à l'ensemble des gènes de biosynthèse et de transport des AMs et montré que presque tous étaient également régulés négativement suite à une carence en nutriments, et pour certains d'entre eux, partiellement à travers la RS. La dichotomie entre gènes régulés indépendamment et partiellement par la RS m'a conduit à proposer un modèle selon lequel, suite à des signaux induisant spécifiquement la RS, les intermédiaires de synthèse issus de l'activité de FAS-II seraient détournés pour la synthèse de lipides alternatifs. Enfin, l'analyse dans ces conditions du profil d'expression de régulateurs transcriptionnels a permis de mettre en évidence des boucles de rétrocontrôle négatif dans le circuit de régulation  $MprAB \rightarrow SigE \rightarrow Rel_{Mtb}$  [voir Introduction § II, D, b)]. L'ensemble de ces résultats apparaissent dans l'article présenté dans la section suivante [article p. 72].



**B. Article :** "Evolution of mycolic biosynthesis genes and their regulation during starvation in *Mycobacterium tuberculosis*"





# Evolution of Mycolic Acid Biosynthesis Genes and Their Regulation during Starvation in *Mycobacterium tuberculosis*

Stevie Jamet,<sup>a,c</sup> Yves Quentin,<sup>b,c</sup> Coralie Coudray,<sup>a,c\*</sup> Pauline Texier,<sup>a,b,c</sup> Françoise Laval,<sup>a,c</sup> Mamadou Daffé,<sup>a,c</sup> Gwennaele Fichant,<sup>b,c</sup> Kaymeuang Cam<sup>a,c</sup>

Centre National de la Recherche Scientifique, IPBS, UMR 5089, Toulouse, France<sup>a</sup>; Centre National de la Recherche Scientifique, LMGM, UMR 5100, Toulouse, France<sup>b</sup>; Université Toulouse, UPS, Toulouse, France<sup>c</sup>

## ABSTRACT

*Mycobacterium tuberculosis*, the etiological agent of tuberculosis, is a Gram-positive bacterium with a unique cell envelope composed of an essential outer membrane. Mycolic acids, which are very-long-chain (up to C<sub>100</sub>) fatty acids, are the major components of this mycomembrane. The enzymatic pathways involved in the biosynthesis and transport of mycolates are fairly well documented and are the targets of the major antituberculous drugs. In contrast, only fragmented information is available on the expression and regulation of the biosynthesis genes. In this study, we report that the *hadA*, *hadB*, and *hadC* genes, which code for the mycolate biosynthesis dehydratase enzymes, are coexpressed with three genes that encode proteins of the translational apparatus. Consistent with the well-established control of the translation potential by nutrient availability, starvation leads to downregulation of the *hadABC* genes along with most of the genes required for the synthesis, modification, and transport of mycolates. The downregulation of a subset of the biosynthesis genes is partially dependent on Rel<sup>Mtb</sup>, the key enzyme of the stringent response. We also report the phylogenetic evolution scenario that has shaped the current genetic organization, characterized by the coregulation of the *hadABC* operon with genes of the translational apparatus and with genes required for the modification of the mycolates.

## IMPORTANCE

*Mycobacterium tuberculosis* infects one-third of the human population worldwide, and despite the available therapeutic arsenal, it continues to kill millions of people each year. There is therefore an urgent need to identify new targets and develop a better understanding of how the bacterium is adapting itself to host defenses during infection. A prerequisite of this understanding is knowledge of how this adaptive skill has been implanted by evolution. Nutrient scarcity is an environmental condition the bacterium has to cope with during infection. In many bacteria, adaptation to starvation relies partly on the stringent response. *M. tuberculosis*'s unique outer membrane layer, the mycomembrane, is crucial for its viability and virulence. Despite its being the target of the major antituberculosis drugs, only scattered information exists on how the genes required for biosynthesis of the mycomembrane are expressed and regulated during starvation. This work has addressed this issue as a step toward the identification of new targets in the fight against *M. tuberculosis*.

*Mycobacterium tuberculosis*, the etiological agent of tuberculosis, infects one-third of humans worldwide, with 9 million new cases and 1.5 million people dying each year from this disease (77). A long-standing challenge to the fight against tuberculosis is the ability of the pathogen to develop a nonreplicating, persistent, drug-tolerant form (1–3). In addition, the emergence of multi-drug-resistant (MDR), extremely drug-resistant (XDR) (4, 5), and total-drug-resistant (TDR) strains (6) underscores the urgent need to identify new therapeutic targets through a better understanding of the genetic programs developed by the bacterium to enable infection.

*M. tuberculosis* has an unusual cell envelope, characterized by an outer membrane (the mycomembrane) consisting largely of long-chain mycolic acids (MA) and a number of atypical lipids (7, 8). Most of these lipids are important to the viability and/or virulence of the bacteria (9), which is why much effort continues to be devoted to identifying, analyzing, and targeting enzymes involved in their metabolism (9–13). Consequently, much is known about the pathways responsible for biosynthesis of the mycolic acids and other components of the mycomembrane (Fig. 1A) (8, 14). This synthesis is centered on two fatty acid synthase (FAS) activities, the eukaryotic-type multifunctional single protein FAS-I and the

bacterial-type multiprotein complex FAS-II. FAS-I initiates *de novo* synthesis from an acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) precursor of two products, a C<sub>24</sub>-C<sub>26</sub> acyl-CoA at the origin of the MA  $\alpha$ -branch and a C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> acyl-CoA that is subsequently elongated by FAS-II to produce meromycolates. Various methyltransferases add functional groups to the meromycolates (8). A final conden-

Received 4 June 2015 Accepted 22 September 2015

Accepted manuscript posted online 28 September 2015

Citation Jamet S, Quentin Y, Coudray C, Texier P, Laval F, Daffé M, Fichant G, Cam K. 2015. Evolution of mycolic acid biosynthesis genes and their regulation during starvation in *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 197:3797–3811. doi:10.1128/JB.00433-15.

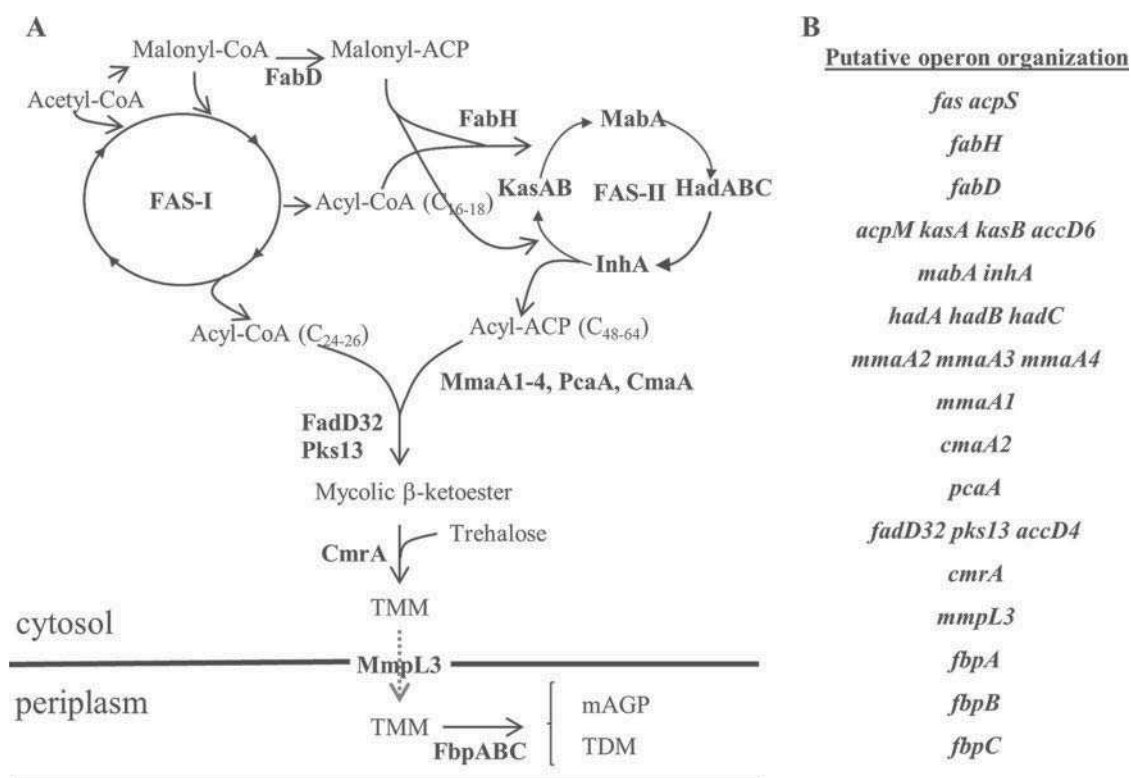
Editor: O. Schneewind

Address correspondence to Gwennaele Fichant, Gwennaele.Fichant@ibcg.biotoul.fr, or Kaymeuang Cam, kaymeuang.cam@ipbs.fr.

\* Present address: Coralie Coudray, Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnemental, Auch, France.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00433-15>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.



**FIG 1** Overview of mycolate biosynthesis and transport. (A) Biosynthesis pathway. The names of enzymes involved in the biosynthesis or transport are in bold (see the text). The dashed arrow indicates transport across the inner membrane. TMM, trehalose-mono-mycolate; TDM, trehalose-dimycolate; mAGP, mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan. (B) Genetic organization of genes involved in the biosynthesis. The operon organization is from the Database of Prokaryotic Operons (76) (<http://csbl.bmb.uga.edu/DOOR/>).

sation step forms the mature  $\alpha$ -alkyl  $\beta$ -ketoacyl-MA, which is then transported across the cytoplasmic membrane as a trehalose-monomycolate (TMM) molecule by the inner membrane MmpL3 transporter. In the periplasmic compartment, the mycoloyltransferase Ag85 either transfers the mycoloyl moiety of TMM to the envelope arabinogalactan layer or generates a trehalose-dimycolate (TDM) molecule (Fig. 1A). Although some issues are not settled (notably, the step at which the methyltransferases introduce the functional groups into the meromycolate chains), the biochemistry of MA synthesis is fairly well documented. In contrast, less is known about the regulatory circuits that control the expression of the  $\sim 30$  genes involved in the biosynthesis of MA (Fig. 1B). A few transcription regulators that directly regulate the biosynthesis genes have been identified. FasR regulates the expression of the *fas* gene (15), while MabR (16) and FadR (17) regulate the expression of the *fabD-accD6* cluster, the *fasII* operon (Fig. 1B). However, the environmental cues that trigger these regulatory pathways and their physiological roles are not yet known. Several genome-wide microarray studies of cells challenged with various stresses, including nutrient deprivation (18–20) and those experienced by bacteria during infection (21), have shown that genes involved in MA synthesis are likely to be regulated. However, with the exception of a predictive analysis (22), none of these studies specifically addressed the regulation of the whole set of MA genes. Therefore, only a partial picture of the regulation of MA biosynthesis is available. Two genome-wide microarray studies reported the expression profile of *M. tuberculosis* genes during starvation (23, 24). However, as far as MA biosynthesis is con-

cerned, there were a number of discrepancies between these studies, confirming suggestions that conclusions based on genome-wide approaches should be experimentally verified (25).

Among the enzymes of the FAS-II multiprotein synthase, the dehydratases HadAB and HadBC were the last to be identified in *M. tuberculosis* (26) and in *Mycobacterium smegmatis* (27). The observation that the *hadABC* genes are localized downstream of genes encoding tRNAs and one ribosomal protein suggested a coordination of MA biosynthesis with translation potential. The stringent response (SR) is a universal adaptive response that regulates this potential under starvation conditions. The outcome of the SR is the upregulation of stress response genes and the downregulation of genes encoding the translational machinery and, more globally, of genes involved in energy-consuming processes, such as DNA replication and the synthesis of peptidoglycan and phospholipids (28–31). The SR is required for virulence of many pathogens (32). For *M. tuberculosis*, the SR, although not essential for survival inside macrophages, is critical for survival during long-term *in vitro* starvation (33, 34), virulence in the guinea pig model (35), and persistence in mice and artificial granulomas (24, 36, 37).

In this study, we report that the *hadABC* genes are part of an operon that includes genes required for translation and that as such they are coregulated by the SR. By phylogenetic reconstruction, the key evolutionary steps that have shaped the genetic organization at the *hadABC* locus in *Actinobacteria* have been identified. Finally, an integrated picture of the regulation of all MA synthesis genes by starvation and the SR is presented.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.** The bacterial strains and the plasmids used in this study are listed in Table S1. For liquid cultures of mycobacteria strains, Middlebrook 7H9 medium supplemented with 0.05% Tween (Sigma-Aldrich), glycerol (0.2%) and ADC (bovine albumin, fraction V; dextrose; catalase) or OADC (oleic acid plus ADC) was used. The incubation temperature was 37°C. For solid medium, no Tween was added and Middlebrook 7H10 and 7H11 were used for *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*, respectively. When required, antibiotics were added: zeocin at 15 µg/ml, kanamycin (Kan) at 37.5 µg/ml, and hygromycin (Hyg) at 150 µg/ml (*M. smegmatis*) and 50 µg/ml (*M. tuberculosis*). In liquid medium, zeocin was omitted, as we noticed that resistance to zeocin was efficient only in solid medium. To induce, respectively, the *tetRO* and  $P_{AMIE}$  promoters, tetracycline (20 ng/ml) and acetamide (0.2%) were added. Luria-Bertani medium was used for the growth of *Escherichia coli* strains with antibiotics when required (Kan, 37.5 µg/ml; Hyg, 150 µg/ml).

**Starvation assay.** For *M. tuberculosis*, standing cultures grown to mid-log phase in 7H9 plus Tween, glycerol, and ADC were harvested at mid-logarithmic growth phase, washed once, and resuspended in an equal volume of TBST buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7], 150 mM NaCl, 0.05% Tween 80). The suspensions were then further incubated for 6 h before being processed for RNA preparation. Cultures for each strain were in triplicate (biological). For lipid preparation, the same growth conditions were used, except that Tween was replaced with 0.05% tyloxapol (Sigma-Aldrich) and the cell suspensions in TBST buffer were incubated for 96 h (a single biological and technical experiment).

**Plasmid construction.** pGBT was constructed by cloning the *C. glutamicum tetRO* region from the pMIND vector into the pGB9.2 plasmid. The *C. glutamicum tetRO* region, including the upstream tandem *rrn1* transcription terminators, was amplified by PCR, gel purified (Qiagen), cloned in pJET1.2 (Fermentas), digested with *AseI* and *SpeI* (Fermentas), gel purified, and cloned in pGB9.2 digested with the same restriction enzymes. Insertion was checked by sequencing (Eurofins). pLAM was constructed by replacing the Kan<sup>r</sup> gene with the Hyg<sup>r</sup> gene from pJV53H. pLAM-*rv0634A* was constructed by PCR amplification of the *rv0634A* open reading frame (ORF) from strain H37Rv using the primers Rv0634Aup and Rv0634Adown. The up primer contains a 5'-end *NdeI* restriction site, and the down primer contains a 5'-end *BamHI* restriction site. The PCR product was digested with *NdeI* and *BamHI* and cloned into pLAM digested with the same enzymes. pGBT-*rel<sub>Mtb</sub>* was constructed by PCR amplification of the *rel<sub>Mtb</sub>* ORF from strain H37Rv using RelMtbup and RelMtbdown primers. The up primer contains a consensus Shine-Dalgarno sequence upstream of an ATG start codon and a 5'-end *Bsu36I* restriction site. The down primer contains a 5'-end *BamHI* restriction site. Insertion was checked by sequencing (Eurofins). pGBG was constructed by cloning a Shine-Dalgarno *egfp* gene fragment between the *Bsu36I* and *SpeI* sites of pGBT. The *tetRO* promoter was then removed by an *XhoI*-*BamHI* deletion. Operon fusions were constructed by cloning PCR fragments between the *XhoI* and *Bsu36I* sites of pGBG.

**Green fluorescent protein (GFP) activity measurements.** *M. smegmatis* strains were cultivated for 2 days in 7H9-based medium; then 4 ml was centrifuged, and the pellet was washed twice with 1× phosphate-buffered saline (PBS) plus 0.1% Tween and resuspended in 1 ml of the same buffer. Fluorescence at 520 nm (excitation at 485 nm) and the optical density at 590 nm (OD<sub>590</sub>) were measured in technical duplicates in a 96-well plate with the Clariostar reader (BMG). Relative fluorescence (in relative fluorescence units [RFU]) is the ratio of fluorescence to the OD value.

**Construction of *rel<sub>Mtb</sub>* and *rv0634A* deletion mutants.** The mutants were constructed by the recombineering method, as described by van Kessel and Hatfull (38), with two modifications. The recombineering resulted in a hygromycin-resistant derivative (instead of the original kanamycin-resistant plasmid). The allelic exchange segment (AES) was generated with a two-step PCR procedure. In the first step, 3 PCRs were

performed to amplify two fragments ~500 to 600 bp long corresponding to the upstream and downstream regions of the ORF that was to be deleted and the ~700-bp zeocin resistance cassette (the *Streptoalloteichus hindustanus ble* [*sh ble*] gene). The three products were gel purified (Qiagen) and used in the second step for a three-fragment fusion PCR to generate the AES. The product was gel purified and used to transform a competent recombineering strain. Selection was performed on 7H10 medium containing zeocin at 15 µg/ml. Incubation was done at 37°C. PCR with cell lysates was performed to check for the replacement of the target gene by the zeocin cassette and for the absence of the wild-type region. The absence of a specific transcript was also checked by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR). The recombineering plasmid (pJV53) was cured from the mutant by successive growth without selection, and its loss was checked by plating on hygromycin-containing solid medium.

**Total-RNA preparation.** Cultures of the *M. tuberculosis* strains were grown to an A<sub>600</sub> of ~0.6. Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions, with slight modifications. Briefly, 20 ml of culture was centrifuged for 5 min at 3,500 rpm, and the pellet was resuspended in 1.2 ml of 0.1% β-mercaptoethanol containing RLT lysis buffer (Qiagen) along with 0.1-mm-diameter glass beads. Cells were then lysed by two 120-s pulses at full speed in a bead beater device. The sample was centrifuged at 14,000 rpm for 30 s and filtered twice through 0.22-µm filter units (Millipore) to sterilize it before releasing it outside the biosafety level 3 (BSL-3) laboratory. One volume of absolute ethanol was then added to the filtrate, and total RNA was purified with an RNeasy column following the manufacturer's procedure. To remove all genomic DNA contamination, the RNA sample was treated twice for 45 min successively with 3 U and 2 U of Turbo DNase (Turbo DNA free kit; Ambion). Biological triplicates were performed for each condition.

**RT-qPCR.** For each sample, 1 µg of RNA was reverse transcribed using random hexamers and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. qPCR of purified cDNA was performed using KAPA SYBRFAST qPCR master mix universal (CliniSciences) and primer sets (see Table S6 in the supplemental material). qPCR for each sample was performed in technical duplicate in a Bio-Rad CFX96 thermocycler with the following protocol: denaturation at 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 3 s and annealing and elongation with data collection at 60°C for 20 s. Standard curves and melting curves were obtained to check for the high amplification efficiency and the specificity of each primer pair, respectively. For qPCR, the mean threshold cycle (*C<sub>T</sub>*) values were normalized against *sigA* *C<sub>T</sub>* values to monitor the expression of the wild-type WT strain under test and control conditions. To calculate *rel<sub>Mtb</sub>*/WT expression ratios, *C<sub>T</sub>* values were normalized against *dnaJ1* *C<sub>T</sub>* values, as *dnaJ1* was previously reported to be a suitable control to compare expression between the WT and *rel<sub>Mtb</sub>* strains (24, 34). The difference in expression (*n*-fold) was calculated using the Pfaffl method (39). Statistical significance was determined by comparing *C<sub>T</sub>* values using a two-tailed unpaired Student *t* test.

**5' RNA linker-mediated random amplification of cDNA ends (5' RLM-RACE).** For transcription start site (TSS) mapping, full-length mRNAs with 5'-triphosphate (5'-PPP) were enriched by incubating total RNA (3 µg) for 60 min with 3 U of Terminator 5'-phosphate-dependent exonuclease (Epicentre), which specifically digests degraded RNA with a 5'-monophosphate (5'-P). After a phenol extraction and ethanol precipitation, the remaining full-length 5'-PPP mRNAs were treated with 1 U of RNA 5' polyphosphatase (Epicentre) for 30 min in order to generate mRNA with a 5'-P end. The reaction was stopped by phenol extraction and ethanol precipitation. The GeneRacer kit (Ambion) RNA adapter was then ligated to the 5'-P end of the mRNA according to the manufacturer's instructions. The ligated mRNA was phenol extracted, ethanol precipitated, and reverse transcribed using a gene-specific primer (GSP) and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). The amplification of 5' cDNA ends was performed using the GeneRacer 5' primer and a GSP, following by a second PCR amplification using the GeneRacer 5' nested

primer and a GSP to prevent nonspecific amplification. Each PCR product was gel purified (Qiagen), cloned in the pJET1.2 plasmid (Fermentas), and sequenced (Eurofins).

**Phylogenomics analyses.** The complete *Actinobacteria* genome entries were retrieved from the EBI (European Bioinformatics Institute; <http://www.ebi.ac.uk/genomes/bacteria.html>) and processed by a set of Perl programs into a MySQL database. An RPS (reversed-position specific) BLAST database was computed by retrieving the profiles corresponding to the Conserved Domain Database from the NCBI server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>). We used the RPS BLAST program and the RPS BLAST database to annotate the conserved domains identified in the protein sequences. We computed pairs of one-to-one ortholog proteins with BLASTP as follows: proteins *a* and *b* from genomes A and B are considered orthologs if *a* is the best hit for *b* in genome A and vice versa, and if *a* (or *b*) has a paralogous protein named *c*, then the score of *a* versus *b* should be greater than the score of *a* (or *b*) versus *c*.

**Identification of orthologous loci.** By querying our *Actinobacteria* database, we retrieved, for each genome (one per species), the proteins orthologous to RPMG2 or HadB proteins from *M. tuberculosis*. The genetic organization around the *rpmG2* (*hadB*) gene was analyzed in all genomes in which orthologs of RPMG2 or HadB were identified. Genes involved in microsynteny were identified, and the conserved domains (clusters of orthologous groups [COG]) characterizing their gene products were retrieved. The microsynteny was thus described by a cluster of COGs (see Table S5 in the supplemental material) that are present between two anchor genes: *rpmG2* (upstream) and *rpoC* (downstream). Each *Actinobacteria* genome was screened for the presence of this cluster of COGs by delimitating the search in a region up to 40 kb between the two anchor genes. For each COG from our cluster, we verified that the corresponding genes identified at the locus in the different genomes form a set of orthologous genes.

**Construction of a phylogenetic tree of *Actinobacteria*.** The *Actinobacteria* phylogeny was inferred from a concatenated sequence alignment obtained for a sample of 56 conserved protein families selected as follows. We used RPS BLAST (40) to functionally annotate the whole protein set of each complete genome with the COG profiles downloaded from the NCBI CDD (Conserved Domains Database) repository (41). We selected a sample of 131 complete *Actinobacteria* genomes which includes only one genome per species. A first set of 149 COG families conserved in this sample were selected according to the quality of the alignments (an E value of  $<1e^{-5}$  and an alignment coverage of at least 70% of the COG profile). The alignments for each COG family were created using the MUSCLE program (42) with the default parameters. We used the trimAl program (43) to remove spurious sequences and poorly aligned positions and to analyze the quality of the alignments according to gap numbers and residue conservation in the columns of the alignments. We used the automated parameters that were recommended by the authors to reconstruct maximum-likelihood trees. We retained the 56 top best sequence alignments. The maximum-likelihood trees were computed with PhyML (44), the ProtTest3 program, to select the optimal combinations of parameters (45). The most frequent combination was the LG model of sequence evolution with a  $\gamma$  correction (four categories of evolutionary rates) and shape parameter and proportion of invariant sites estimated from data. When a species did not have a record for a COG family, the missing sequence was replaced by gaps in the alignment. The aligned sequences of 56 COG families for the 131 species were concatenated to produce a single alignment of 16,329 aligned positions, including 2,685 sites without polymorphisms (16.44%). The concatenated tree was computed with PhyML with the parameters selected by ProtTest3, and the statistical branch support was inferred with the parametric bootstrap. The tree was rooted according to the work of Sen and collaborators (46). Our tree topology appears to be globally congruent with the one published by these authors. The tree was drawn with the online version of iTOL (47). Locus organizations were designed by using the protein domain symbolism provided by iTOL.

**Phylogenetic tree of mycobacterium methyltransferases.** Protein sequences homologous to *M. tuberculosis* methyltransferases were identified through a BLASTP (40) search against the protein sequences encoded by each mycobacterium genome of our selection. The homologous methyltransferases identified in the genomes of *Segniliparus rotundus*, *Tsukamurella paurometabola*, and *Nocardia brasiliensis* were added to the analysis. The multiple alignments were performed using the MUSCLE program (42) with the default parameters. The maximum-likelihood tree was computed with PhyML (44) with the optimal combination of parameter selected by ProtTest3 (45), i.e., an LG model of sequence evolution with a  $\gamma$  correction (four categories of evolutionary rates) and the shape parameter and the proportion of invariant sites estimated from the data. The statistical branch supports were inferred with the parametric bootstrap. The tree was drawn with the online version of iTOL (47).

## RESULTS

***hadABC* is coexpressed with genes involved in translation.** The location of *hadABC* downstream of genes encoding two tRNAs (*thrT* and *metT*) and the L33 ribosomal protein (*rpmG2*) suggested coordination between the translation potential and the biosynthesis of mycolic acids. As a first step toward revealing this relationship, the transcription organization of the cluster was analyzed. To identify the transcription units, specific cDNAs from total RNA preparations were synthesized by PCR using a downstream primer matching the 3' end of *hadC* ( $R_{R-}$ ) and various upstream primers along the cluster (Fig. 2). A single transcription unit encompassing the three *had* genes was detected with the F1-R1 primer pair, confirming that the three genes form an operon, in agreement with both the operon browser of the TbDB database ([http://tuberculosis.bu.edu/tbdb\\_sysbio/operon](http://tuberculosis.bu.edu/tbdb_sysbio/operon)) and the database of prokaryotic operons (<http://csbl.bmb.uga.edu/DOOR>). As expected, a single transcription unit encompassing the *hadABC* genes plus the three translation-related genes (*thrT*, *metT*, and *rpmG2*) was also detected (primers F2-R1 and F3-R1), as was an additional transcription unit extending to *rv0634A*, located just upstream of *thrT* (F4-R2 primers). No amplification was obtained with primers upstream of *rv0634A* (F5-R2 and F6-R2). These results indicated that the *hadA*, *hadB*, and *hadC* genes were part of an operon composed of at least seven genes, in agreement with the MycoRRdb database (<http://mycorrd.buohbif.in>). To better define the expression pattern of the whole cluster, transcription start sites (TSSs) were determined by 5' RLM-RACE (Fig. 3). Five TSSs were mapped, one upstream of the *hadA* gene, two upstream of the *metT* gene, and two inside the *rv0634A* ORF. These results indicated that *hadABC* could be either independently expressed as a single operon (*had* operon), coexpressed with the translation genes (*tha* operon), or coexpressed with both the *tha* operon and the putative transcription regulator *rv0634A* gene (*rth* operon). The mapping of the most upstream TSS inside the *rv0634A* ORF suggested that the TTG codon start for this gene was misannotated. The ATG codon located 39 bp further downstream is likely the real start codon, with the TSS at the A of this codon (Fig. 3). The inside TSS mapped on the 74th nucleotide at a G. The *metT*-proximal +1 nucleotide is a G, the first nucleotide of the *metT* tRNA. The *had* operon +1 nucleotide is the G of the GTG start codon. The mapping of these TSSs was in agreement with the transcriptome shotgun sequencing (RNA-seq) global study reported in reference 48. Accordingly, a fairly conserved -10 box sequence could be found upstream these five TSSs (49). We identified two additional sites, 65 nucleotides before the end of *rv0634A* gene and 2 nucleotides downstream of the *thrT* sequence

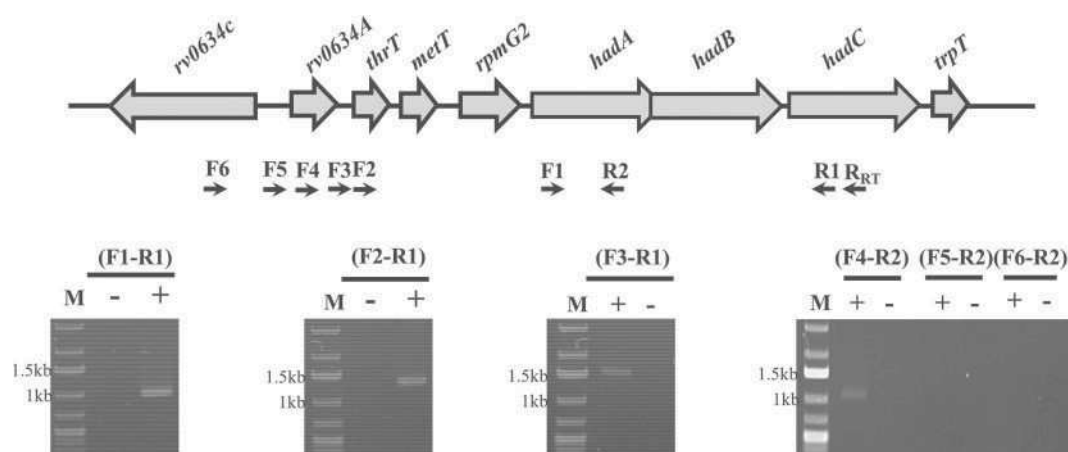


FIG 2 The *hadABC* genes are coexpressed with translation process and transcription regulator genes. Transcription units were identified by RT-PCR. The forward (F1 to -6) and reverse (R1 and -2) primers used to identify the transcription units as well as the primer used to synthesize the cDNA ( $R_{RT}$ ) are symbolized by arrows below the genetic map. Results of representative PCRs on reverse transcriptase-treated (+) or untreated (–) templates run on agarose gels are shown. M, DNA ladder.

(Fig. 3). However, neither a  $-10$  box nor promoter activity (see below) was associated with these sites, suggesting that they were false-positive TSSs and likely resulted from natural or experimental RNA cleavages.

To correlate the transcription start sites with promoter activities, the whole region was subcloned downstream of two strong ribosomal T1T2 transcription terminators and upstream of the *gfp* reporter gene in a low-copy-number plasmid. The operon fusions were introduced into *M. smegmatis* and GFP fluorescence specific activities were measured in 2-day-old cultures (Fig. 4). The pGBG vector without any cloned fragment gave the back-

ground level. The  $F_A$  and  $F_B$  constructs indicated promoter activity specifically associated with the two TSSs located inside the predicted *rv0634A* ORF. In contrast, no promoter activity was detected in the  $F_C$  fusion, suggesting that the 5' end of the RNA detected at the 3' end of *rv0634A* likely resulted from a cleavage. The  $F_{12}$  and  $F_1$  constructs confirmed the promoter activity associated with the 2 TSSs mapped upstream of *thrT*. The absence of any GFP activity in the  $F_2$  construct suggested that the 5' end that mapped 2 nucleotides downstream of the *thrT* gene likely resulted from cleavage. The  $F_3$  construct pointed to promoter activity associated with the TSS that mapped at the beginning of the *hadA*

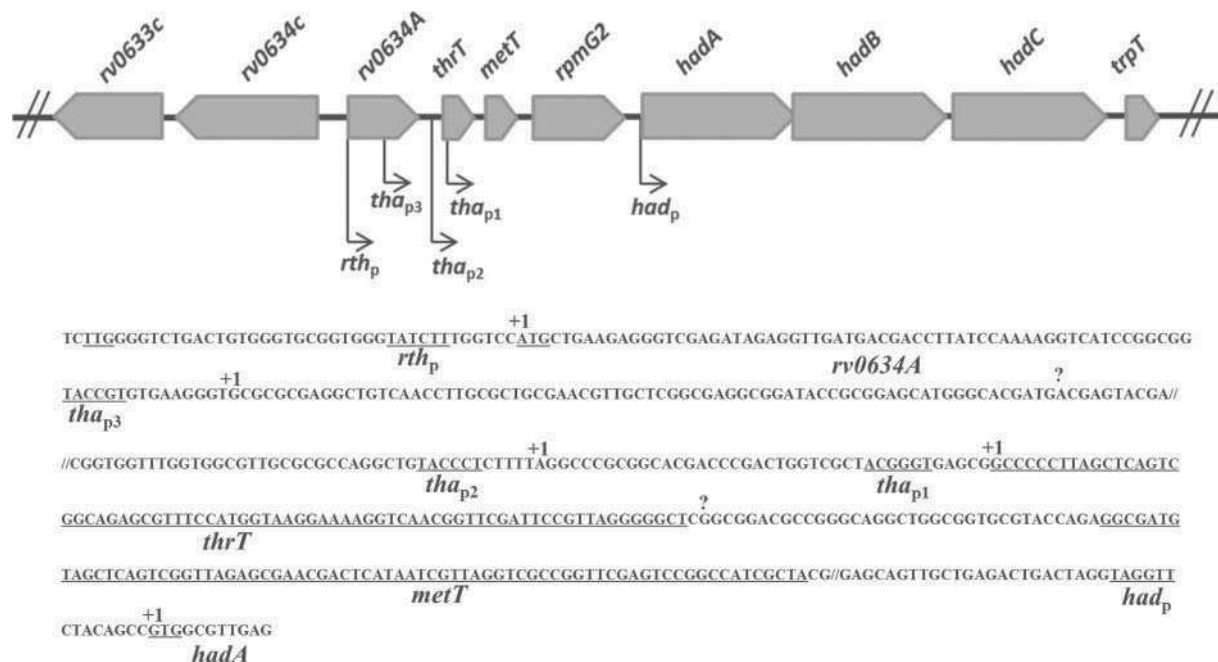


FIG 3 Identification of five transcription start sites in the *rth* cluster. Transcription start sites (TSSs) mapped by 5' RLM-RACE are symbolized by broken arrows on the genetic map and are associated with promoter names. On the partial sequence extending from *rv0634A* to the 3' end of *hadA*, the TSSs are shown (+1). The question marks indicate detected 5'-end RNAs that are unlikely to correspond to TSSs. Putative  $-10$  boxes, proposed start codons, and tRNA-encoding gene sequences (*thrT* and *metT*) are underlined.

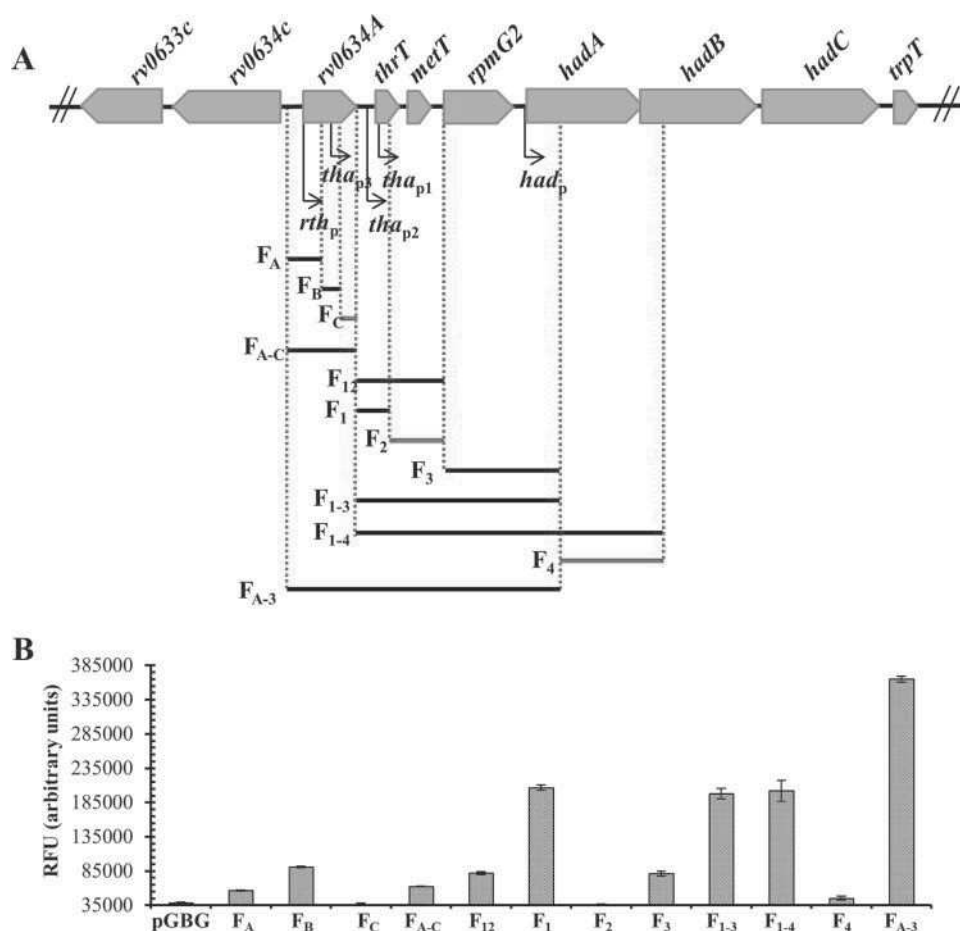


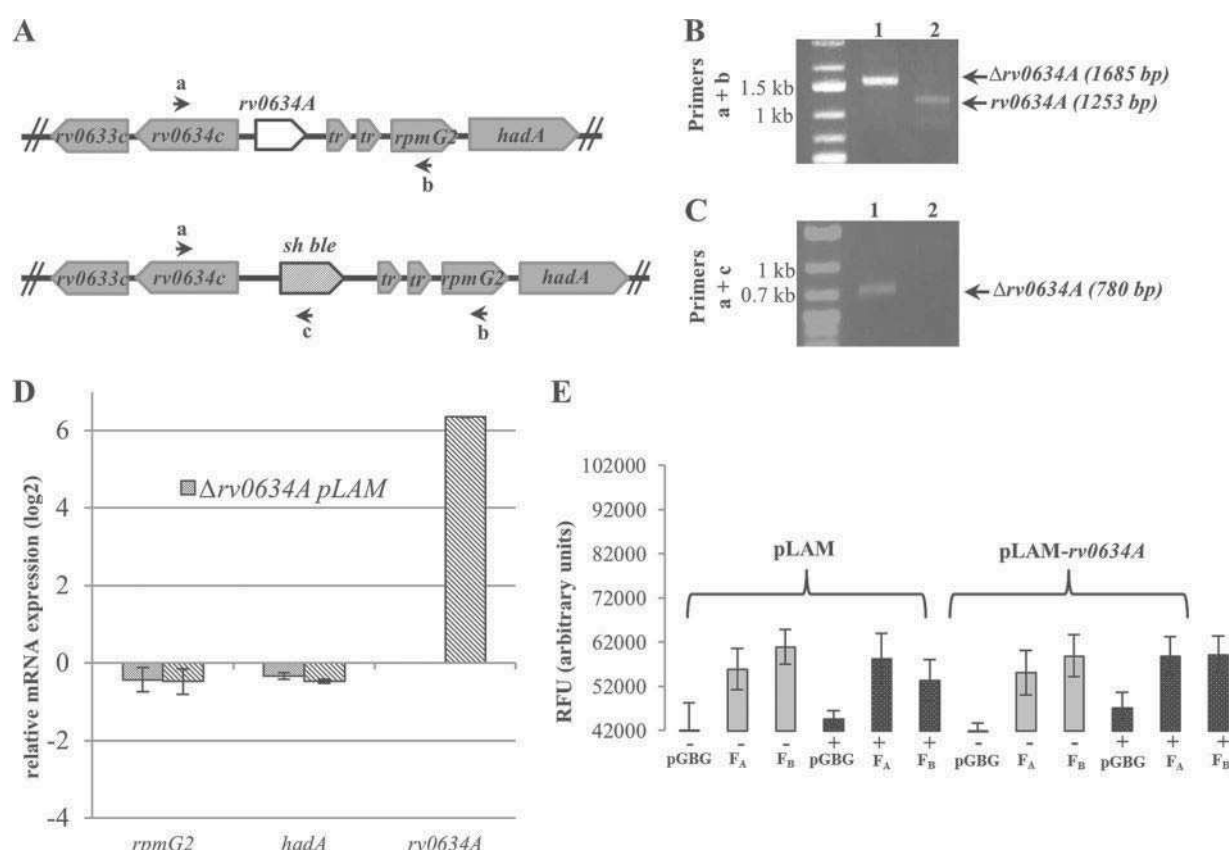
FIG 4 Identification of five promoter activities in the *rth* cluster. (A) DNA fragments cloned in the GFP reporter vector are shown under the genetic map. Fragments which do not contain any promoter activity are in red. (B) The fluorescence specific activity is expressed in relative fluorescence units (RFU) and is the mean for biological triplicates. pGBG is the *gfp* promoterless control. Error bars show standard deviations.

sequence. In agreement with the absence of any other TSS in the *hadABC* sequence, no promoter activity was detected in fragments containing sequences beyond the beginning of *hadA* ( $F_A$ ) (data not shown). Taken together, these results indicated that the *hadABC* genes could be transcribed from five promoters (Fig. 4).

**The putative transcription regulator Rv0634A does not regulate the *rth* operon.** Rv0634A belongs to the mycobacterial core genome (50), and its *Mycobacterium marinum* ortholog MMAR\_0966 is annotated as a putative Arc/MetJ class transcription regulator (<http://mycobrowser.epfl.ch/marinolist.html>) (51). Many transcription regulators regulate neighboring genes as well as their own (52). The genetic organization at the *hadABC* locus suggested that Rv0634A might regulate the expression of the whole cluster. To test this possibility, the gene along with its promoters was deleted from the chromosome (Fig. 5A; also, see Materials and Methods). The deletion was verified by PCR (Fig. 5B and C), confirming the previous prediction that the gene is not essential (53), and the absence of *rv0634A* mRNA was verified by RT-qPCR (Fig. 5D). The amount of *rpmG2* and *hadA* mRNAs of the  $\Delta$ *rv0634A* strain measured by RT-qPCR was not significantly different from that of the WT strain, indicating that neither the putative Rv0634A regulator nor the *rv0634A* promoter (*rthp* and

*thap*<sub>3</sub>) contributes to the expression of the *thrT-hadC* cluster in log phase (Fig. 5D). When *rv0634A* was overexpressed 64-fold from a plasmid-borne acetamide-inducible promoter, no effect on the expression of either *rpmG2* or *hadA* was observed (Fig. 5D), indicating that Rv0634A does not regulate the *rpmG2-hadABC* operon. In addition, in *M. smegmatis*, the overexpression of *rv0634A* did not affect the expression of either the  $F_A$  *gfp* fusion, which indicates the absence of autoregulation of *rv0634A*, or the  $F_B$  fusion, showing that Rv0634A did not regulate the promoter inside the gene (Fig. 5E). Together, these results indicated that Rv0634A does not regulate the transcription of the *rv0634A-hadC* cluster.

**The mycolic acid biosynthesis genes *hadABC* are negatively coregulated with the ribosomal protein gene *rpmG2* by the stringent response.** The stringent response (SR) is a conserved adaptive response that downregulates translation potential in starvation conditions. The molecular hallmark of the SR is the synthesis of the alarmone (p)ppGpp by the RelA/SpoT homolog (RSH), which leads to dramatic reprogramming of cell transcription, including a rapid inhibition of stable RNA synthesis (54). The coexpression of the *hadABC* genes with genes coding for tRNAs and a ribosomal protein suggested that the *hadABC* genes might also be regulated by the SR. To test this proposition, the



**FIG 5** The putative transcription regulator Rv0634A does not regulate the *tha* operon. (A) Genetic map showing the *rv0634A* and *sh ble* allelic exchange. Primers for the deletion analysis by PCR are symbolized by arrows. (B and C) PCR products with the a + b and a + c primer pairs to confirm the deletion of the *rv0634A* gene. Lysates of a  $\Delta$ *rv0634A* strain (1) and of a WT clone (2) were used as PCR templates. (D) Monitoring by RT-qPCR of the expression (log<sub>2</sub>) of the *rpmG2*, *hadA*, and *rv0634A* genes relative to the WT strain values (WT/pLAM) in the *rv0634A* mutant ( $\Delta$ *rv0634A*/pLAM) and in the *rv0634A*-overexpressing background ( $\Delta$ *rv0634A*/pLAM-*rv0634A*). Each strain was cultivated in the presence of 0.2% acetamide. Error bars show standard errors of the means (SEM) from three biological triplicates. (E) Expression, in relative fluorescent units (RFU), of *rthp::gfp* (*F<sub>A</sub>*) and *thap<sub>3</sub>::gfp* (*F<sub>B</sub>*) fusions in *M. smegmatis* carrying a plasmid expressing *rv0634A* from an acetamide-inducible promoter (pLAM12-*rv0634A*) or not (pLAM12). Each strain was cultivated in either the presence (+) or absence (–) of 0.2% acetamide. pGBG was the *gfp* promoterless control.

expression of genes in the *rv0634A*-*hadC* cluster was then measured by RT-qPCR after starvation for 6 and 24 h (approximately one-fourth and one generation time, respectively). As shown in Fig. 6A, in the WT background, the expression of *rel<sub>Mtb</sub>* was up-regulated, as well as that of *sigE* and *mprA*, in agreement with previous reports (23, 24). In contrast, the five genes of the operon were downregulated, either after 6 h starvation only (*rv0634A*), 24 h starvation only (*rpmG2*) or both starvation periods (*hadA*, *hadB*, and *hadC*) (Fig. 6A). To determine the contribution of the SR to this regulation, we deleted *rel<sub>Mtb</sub>*, the *M. tuberculosis* RSH-encoding gene. The construction was checked by PCR (Fig. 6B to D) and by RT-qPCR for the absence of *rel<sub>Mtb</sub>* mRNA (see Tables S2 to S4 in the supplemental material). The expression level was then measured in the  $\Delta$ *rel<sub>Mtb</sub>* background, and the mutant-to-WT expression ratio was determined (Fig. 6E). In log phase, the relative expression of *rv0634A*, *rpmG2*, and the three *had* genes in the  $\Delta$ *rel<sub>Mtb</sub>* background was similar to that in the WT strain and in the complemented strain expressing *rel<sub>Mtb</sub>* from a low-copy-number plasmid (pGBT-*rel<sub>Mtb</sub>*). After starvation, a similar result was observed for *rv0634A*, whereas for *rpmG2*, *hadA*, *hadB*, and *hadC*, the expression ratio was higher for the  $\Delta$ *rel<sub>Mtb</sub>* strain but not for the complemented strain (Fig. 6E). These results indicated that

*rpmG2* and *hadABC* were negatively coregulated by the SR. The magnitude of the repression due to the SR for the four genes was similar (~2-fold) (Fig. 6E), suggesting that the SR exerted its control through the promoter(s) *thap<sub>2</sub>* and/or *thap<sub>1</sub>*, located just upstream of *thrT* (Fig. 4). Thus, in agreement with the genetic organization, these results suggested coordination of the MA biosynthesis with translation potential.

**Starvation leads to a global downregulation of genes required for mycolic acid synthesis.** One might have expected the regulation of the *hadABC* genes by starvation to be coordinated with that of other genes involved in the biosynthesis of MAs. Thus, in order to get an integrated picture of the regulation of MA biosynthesis, the expression of a subset of genes representative of each step of the biosynthesis and transport of MAs was measured after 6 and 24 h starvation. The results are presented in Fig. 7. The expression of *fas*, which is required for the synthesis of the MA  $\alpha$  chain as well as the acyl-CoA substrates for the FAS-II complex (Fig. 1), was downregulated. The gene *fabH* acting at the intermediate step between FAS-I and FAS-II activities was not affected (Fig. 1) (55). Both *fabD* and *acpM*, which are required for the synthesis of FAS-II malonyl-acyl carrier protein (malonyl-ACP) elongation units, were downregulated (at 24 h starvation for *fabD*)



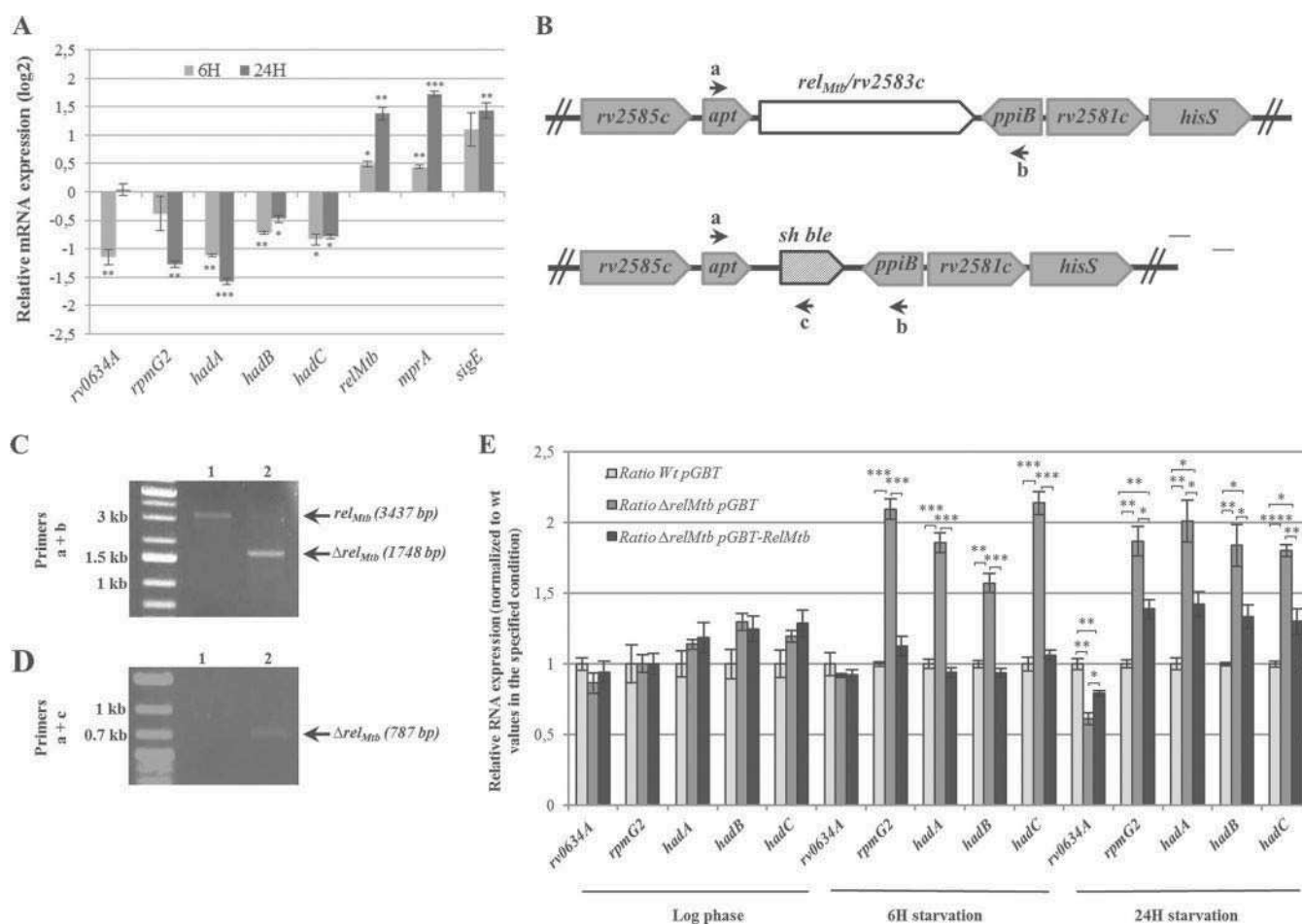


FIG 6 The *tha* operon is regulated by the stringent response. (A) Monitoring by RT-qPCR of the relative expression (log<sub>2</sub>) of the *rv0634A*, *rpmG2*, *hadABC*, *rel<sub>Mtb</sub>*, *mprA*, and *sigE* genes in the WT strain (WT/pGBT) upon 6 and 24 h of starvation. The values are expressed as a ratio to WT values in unstressed log-phase cultures. (B) Genetic map showing the *rel<sub>Mtb</sub>* and *sh ble* allelic exchange. Primers for the deletion analysis by PCR are symbolized by arrows. (C and D) PCR products obtained with the a+b and a+c primer pairs to confirm the deletion of the *rel<sub>Mtb</sub>* gene. Lysates of the WT strain (lanes 1) and of a  $\Delta rel_{Mtb}$  clone (lanes 2) were used as PCR templates. (E) Gene expression ratio relative to values for the WT/pGBT strain from log phase, upon 6 and 24 h of starvation, respectively. In panels A and E, error bars represent SEM from three biological triplicates. *P* values were <0.05 (\*), <0.01 (\*\*), <0.001 (\*\*\*), and <0.0001 (\*\*\*\*).

(Fig. 1). Along with *hadABC*, the genes involved in the four reaction steps driven by the FAS-II complex, *kasA*, *mabA*, and *inhA*, were also downregulated (Fig. 1). Of the two genes involved in the condensation of the FAS-I and FAS-II products, *fabD32* appeared not to be regulated, whereas *pks13* was downregulated after 6 h of starvation (Fig. 1). The genes required for the subsequent reduction step (*cmrA*) and the transport of TMM across the inner membrane (*mmpL3*) were also downregulated at 6 h starvation (Fig. 1). Among the three genes involved, the synthesis of the mycoloyl-transferase antigen Ag85 complex gene, *fbpA*, was downregulated at 6 and 24 h, that of *fbpB* was downregulated at 6 h, and the expression of the third and most active Ag85 subunit gene, *fbpC* (Fig. 1) (56, 57), was upregulated at both 6 and 24 h. Among the six methyltransferase genes known to be involved in decorating the meromycolic chain in *M. tuberculosis* (Fig. 1), *pcaA* and *cmaA2* were upregulated (at 24 h for *cmaA2*), whereas *mmaA1* to -4 were downregulated (at 6 h for *mmaA1* and *mmaA3*). Therefore, upon starvation, the expression of most of the MA biosynthesis genes was affected, and with few exceptions, the expression was lower. To determine the contribution of the SR to this regulation, gene

expression was measured in the  $\Delta rel_{Mtb}$  mutant as well, and the ratio to the WT values was determined. The complete data are presented in Tables S2 to S4 in the supplemental material. With an arbitrary cutoff ratio of 1.4, Table 1 lists the genes whose expression was affected by the  $\Delta rel_{Mtb}$  mutation after 24 h starvation. This set included *acpM*, the FAS-II complex genes *hadABC* and *kasA*, the Ag85 *fbpA* gene, and the methyltransferase genes *mmaA2*, *mmaA3*, *cmaA2*, and *pcaA*. It is worth noting that *acpM* and *kasA* were the only genes to be positively regulated by the SR, despite the fact that the interplay between the different regulatory pathways that have been induced by our experimental starvation conditions ultimately led to the downregulation of both genes. Therefore, during severe starvation, most of the mycolate biosynthesis genes were regulated, whereas environmental signals specifically triggering the SR would regulate only a small gene subset. This later observation was in agreement with microarray studies of Dahl and coworkers showing that only 5 genes involved in MA biosynthesis were regulated by *Rel<sub>Mtb</sub>* following 6 h of starvation (24). These genes also include *hadB*, *hadC*, and *fbpA*, along with the FAS-II gene *mabA* and the Ag85 gene *fbpC*.

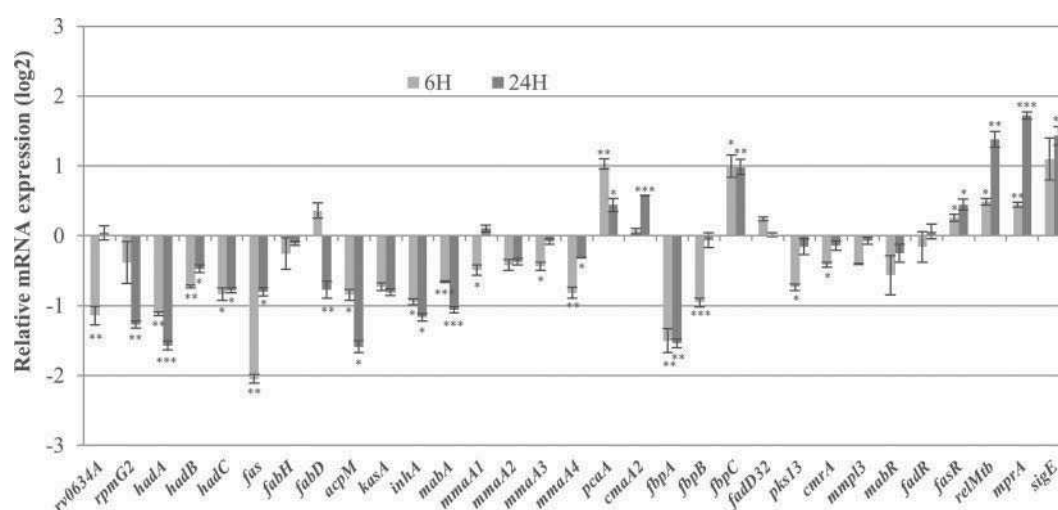


FIG 7 Regulation of mycolic acid biosynthesis, transport, and regulator genes upon starvation. The WT strain (WT/pGBT), was grown to log phase and was starved for 6 or 24 h before total-RNA sampling. (A) The relative expression of the genes representative of the major steps of the mycolic acid biosynthesis and transport was measured by RT-qPCR. The values are expressed in  $\log_2$  as a ratio to values for unstarved log-phase WT cultures. Error bars show SEM from three biological triplicates. *P* values were  $<0.05$  (\*),  $<0.01$  (\*\*), and  $<0.001$  (\*\*\*).

Few transcription regulators of MA genes have been characterized at the molecular level, namely, FasR, which activates the *fas* gene (15), MabR, which represses the *fasII* operon (*fabD-acpM-kasA-kasB-accD6*) and the *fas* gene (16), and FadR, a repressor of the *fasII* operon (17). As shown in Fig. 7, neither *mabR* nor *fadR* was regulated by starvation, whereas *fasR* was slightly upregulated during 6 and 24 h starvation independently of *Rel<sub>Mtb</sub>*. The expression of *rel<sub>Mtb</sub>* was reported to be indirectly activated by MprA, which regulates the response of the MprAB two-component system through the sigma factor SigE (58–60). Both the corresponding genes, *mprA* and *sigE*, were also upregulated by starvation, suggesting that these genes might also contribute to the upregulation of the *rel<sub>Mtb</sub>* gene during starvation. Interestingly, the expression of both *mprA* and *sigE* was lower in the WT than in the *rel<sub>Mtb</sub>* mutant (Table 1), suggesting negative feedback control of both genes by *Rel<sub>Mtb</sub>*.

**Phylogenetic reconstruction of the *rth* operon–*mmaA1*–*mmaA4* cluster.** We undertook a detailed analysis of the *rth* locus

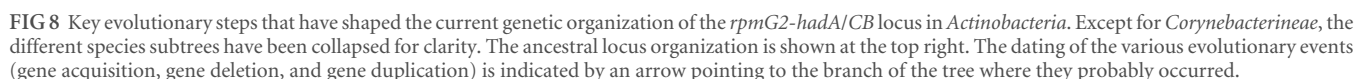
in 131 genomes of *Actinobacteria* (one strain per species) to understand the key evolutionary steps that have shaped the current genetic organization of this locus in mycobacterial genomes and, by extension, in *Actinobacteria* genomes. First, we retrieved for every genome the protein orthologous either to *M. tuberculosis* RpmG2 or to *M. tuberculosis* HadB when the *rpmG2* gene was absent from the studied genome. The genetic context of both genes in all genomes was further analyzed, and microsynteny was detected only downstream of them, with, in about 20 genomes, the following gene order conservation: *rpmG2-hadA-hadB-secE-nusG-rplK-rplA-rplJ-rplL-rpoB-rpoC*. The products of these genes are characterized by specific conserved domains (see the corresponding COG number in Table S5 in the supplemental material). This microsynteny could be disrupted by the insertion of a few other genes, among which *murB* was found at the locus in 54 genomes. In addition, three tRNA genes upstream of *rpmG2* were found to be conserved in order and nature (*tyrT-thrT-metT*) and one upstream gene, *secE* (*trpT*). Thus, we carried out a systematic search of this cluster of COGs on a chromosomal region whose maximal size was set to 40 kb using *rpmG2* or *hadA* as an upstream landmark and *rpoB* and *rpoC* as a downstream limit. The result of this search was plotted over our *Actinobacteria* species tree in order to identify the key evolutionary steps involved in shaping the locus genetic organization (Fig. 8; also, see Fig. S1 in the supplemental material).

From the analysis of the phylogenetic distribution of the locus genes, the organization *rpmG2-secE-nusG-rplK-rplA-rplJ-rplL-rpoB-rpoC* should have been the ancestral locus organization present in the last common ancestor (LCA) of all current *Actinobacteria* species, as (i) those genes are found in almost all genomes, whatever their taxonomic classification (see Fig. S2 in the supplemental material), and (ii) this organization is observed in the genomes of the most ancient groups on the *Actinobacteria* species tree (*Conexibacteraceae* and the *Rubrobacterineae*) (see Fig. S1 in the supplemental material) as well as in genomes outside the *Actinobacteria*, notably in 123 of 219 *Firmicutes* genomes (see Fig. S3 in the supplemental material). From this ancestral organization,

TABLE 1 Genes regulated by the stringent response

Gene	Expression ratio (mean $\pm$ SEM) in strain with genotype <sup>a</sup>		
	WT (pGBT)	$\Delta rel_{Mtb}$ (pGBT)	$\Delta rel_{Mtb}$ (pGBT)- <i>rel<sub>Mtb</sub></i>
<i>rv0634A</i>	1 $\pm$ 0.04	0.61 $\pm$ 0.04	0.79 $\pm$ 0.02
<i>rpmG2</i>	1 $\pm$ 0.03	1.87 $\pm$ 0.10	1.39 $\pm$ 0.07
<i>hadA</i>	1 $\pm$ 0.04	2.01 $\pm$ 0.15	1.42 $\pm$ 0.09
<i>hadB</i>	1 $\pm$ 0.01	1.84 $\pm$ 0.15	1.33 $\pm$ 0.08
<i>hadC</i>	1 $\pm$ 0.02	1.80 $\pm$ 0.04	1.30 $\pm$ 0.09
<i>acpM</i>	1 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.01	1.05 $\pm$ 0.10
<i>kasA</i>	1 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.02	1.17 $\pm$ 0.14
<i>mmaA2</i>	1 $\pm$ 0.02	2.08 $\pm$ 0.29	1.26 $\pm$ 0.08
<i>mmaA3</i>	1 $\pm$ 0.01	1.42 $\pm$ 0.12	1.18 $\pm$ 0.08
<i>cmaA2</i>	1 $\pm$ 0.04	1.46 $\pm$ 0.12	1.13 $\pm$ 0.09
<i>pcaA</i>	1 $\pm$ 0.06	1.54 $\pm$ 0.14	1.23 $\pm$ 0.06
<i>fbpA</i>	1 $\pm$ 0.07	1.73 $\pm$ 0.02	1.19 $\pm$ 0.07
<i>mprA</i>	1 $\pm$ 0.07	1.55 $\pm$ 0.02	1.39 $\pm$ 0.09
<i>sigE</i>	1 $\pm$ 0.07	1.42 $\pm$ 0.02	1.10 $\pm$ 0.10

<sup>a</sup> Expression relative to the wild-type value after 24 h of starvation.



at the origin of all taxonomic groups except *Conexibacteraceae* and *Rubrobacterineae*. In the branch leading to the LCA of *Mycobacterium*, a duplication of the *hadA/C* ancestor gene should have occurred, giving rise to the actual *hadA-hadB-hadC* locus organization found in those species. The absence of the genes *rpmG2*,

*hadA*, and *hadB* from the region upstream of *secE* in the *Corynebacterium* genomes corresponds clearly to a loss of these genes in the genome of their LCA, as the three tRNA genes, *tyrT*, *thrT*, and *metT*, always located upstream of *rpmG2*, are found conserved and located just upstream of the tRNA gene *trpT*, invariably located upstream of *secE*. The absence of both *hadA/C* and *hadB* genes in the *Bifidobacteriaceae* genomes and of *rpmG2* in a group of *Kineosporiineae* genomes forming a subtree on the species tree (see Fig. S1 in the supplemental material) is probably due to the loss of those genes in the LCA genome of each group.

The gene *rv0634A* would have been acquired once on the branch leading to the LCA of the *Mycobacterium avium* and *M. tuberculosis* complexes and of *M. ulcerans*, *M. marinum*, and *M. leprae* (Fig. 8).

Finally, the four methyltransferase genes found at the *M. tuberculosis* locus were acquired through three independent events (Fig. 8). The gene *mmaA4* was acquired first after the speciation of *M. abscessus* on the branch leading to the LCA of the other mycobacterium species and was probably subsequently replaced in *M. smegmatis*. Then, *mmaA1* was gained on the branch leading to the LCA of the *M. avium* and *M. tuberculosis* complexes and *M. ulcerans*, *M. marinum*, and *M. leprae*. Finally, *mmaA2* and *mmaA3* were acquired on the branch leading to the LCA of *M. ulcerans*, *M. marinum*, and *M. leprae* and the *M. tuberculosis* complex. The different acquisition events do not result from successive duplications of the inserted genes, as the subtrees corresponding to *MmaA4*, *MmaA3*, *MmaA2*, and *MmaA1* gene products are not sister groups on the tree built on the homologous methyltransferase from mycobacterium (see Fig. S4A in the supplemental material). However, once acquired, those genes were inherited vertically, since both species and protein trees are congruent (see Fig. S4B in the supplemental material). In some species, some methyltransferase genes became pseudogenes (see Fig. S4B in the supplemental material).

The region extending from *rpmG2* to *rpoC* seems to be a hot spot of recombination, as it has suffered many gene gains and losses. Thus, in a few genomes, the *rpmG2* locus has been disrupted with the organization *secE-nusG-rplK-rplA-rplJ-rplL-rpoB-rpoC* found at a distant chromosomal location (see Fig. S1 in the supplemental material). However, those genomes are found scattered along the species tree, except for the *Bifidobacteriaceae* species, where the disruption events may have occurred in their last common ancestor.

## DISCUSSION

The *M. tuberculosis* mycomembrane is a highly efficient permeability barrier containing many antigenic determinants and is essential to cell viability and virulence. During the process of infection, the bacteria must adapt to various environmental conditions, and little is known of how the biosynthesis of mycolic acids, the major components of the mycomembrane, responds to these conditions, notably to the nutrient scarcity that is believed to prevail inside the host (53, 61). About 30 genes, including *hadA*, *hadB*, and *hadC*, are required for the synthesis and transport of MAs. This study shows that upon starvation, the *had* genes are coexpressed and downregulated with three neighboring genes, *thrT*, *metT*, and *rpmG2*, involved in translation, in accordance with their genetic organization. This result suggests that MA biosynthesis is coordinated with the translation potential of the cell. The

regulation of synthesis of stable RNAs and ribosomal proteins is a hallmark of the stringent response (31), and accordingly, the downregulation was seen to be dependent on a functional Rel<sub>Mtb</sub> protein, the key enzyme of the stringent response. The *hadABC* genes could also be coexpressed with *rv0634A*, the first gene of a seven-gene operon that includes *thrT*, *metT*, and *rpmG2*. Although the *M. marinum* Rv0634A homolog is recorded as a transcription regulator of the Arc/MetJ family (<http://mycobrowser.epfl.ch/marinolist.html>), we have no evidence that Rv0634A was involved in the regulation of this operon. The gene *rv0634A* was reported to belong to the mycobacterial core genes (50) and is conserved in only some slow-growing pathogenic and opportunistic mycobacterial species (Fig. 8; also, see Fig. S1 and S2 in the supplemental material) (62). Despite these observations, the deletion of the gene did not affect the fitness of the bacteria, including the ability to grow in human THP-1 macrophages (our unpublished results). The function of this gene remains to be discovered.

In coordination with the expression profile of the *hadABC* genes, starvation downregulated expression of most genes representative of each step of the synthesis and transport of the MAs. Because MA biosynthesis is a highly energy-consuming process, it makes physiological sense for the cell to slow down its synthesis during nutrient scarcity. Rohde et al. (21) reported that in a comprehensive transcription profiling study over the course of a 14-day infection in resting macrophages, one-third of the genes involved in MA biosynthesis were downregulated. These results agree with the pioneering observations of Lacave and coworkers, i.e., the arrest of MA biosynthesis in stationary phase (63), and are consistent with the observation that during infection, *M. tuberculosis* switches from a carbon to a lipid regimen during which the fatty acid catabolism and the storage compound triacylglycerol (TAG) synthesis pathways are activated instead (64, 65). The expression profile of genes involved in the first (*fas*, *fabH*, and *fabD*) and last (*fadD32*, *pks13*, *cmrA*, *mmpL3*, and *fbpBC*) steps of the biosynthesis pathway and of two of the six genes coding for methyltransferases (*mmaA1* and *mmaA4*) was independent of Rel<sub>Mtb</sub> (Table 1; also, see Tables S2 to S4 in the supplemental material). In contrast, among the genes encoding FAS-II, the *hadABC* operon and *kasA* are regulated by the SR, with the latter being upregulated. Such an uncoupling between the expression of FAS-II genes and that of genes involved in upstream steps such as *fas* has been previously reported during growth arrest. This uncoupling would allow the rerouting of the carbon flux toward the synthesis of storage and stress-protective compounds, such as TAG and glutamate (65). A similar explanation might also apply to our results. A reverse enzymatic pathway during the SR primed at the KasA step would return the meromycolate intermediate products resulting from the activity of FAS-II to FAS-I for the synthesis of alternative fatty acids.

There are several types of MA species, as defined by the functional groups found at two positions on the meromycolate chain. In *M. tuberculosis*, six methyltransferase genes are involved in the introduction of these groups. Two, *pcaA* and *cmaA2*, were upregulated upon starvation, whereas *mmaA1*, *mmaA2*, *mmaA3*, and *mmaA4* were downregulated. Hence, upon starvation, all mycolic acid species should be enriched in decoration stemming from PcaA and CmaA2 activities, i.e., with a cyclopropanation group at the proximal position (8, 66). Cyclopropanation by PcaA and CmaA2 has been shown to be crucial for the virulence of *M.*

*tuberculosis*, implying that specifically enriching MAs in cyclopropanated species might contribute to the adaptive response during infection (67, 68). With the exception of *mmaA1* and *mmaA4*, the expression of the methyltransferase genes was negatively controlled by  $Rel_{Mtb}$ . Therefore, environmental signals specifically triggering the SR should lead to enrichment of MA species with a methyl group at the distal position of oxygenated species due to *MmaA4* activity and at the proximal position of *trans*-methoxy and *trans*-keto species due to *MmaA1* activity (8). The activity of *MmaA4* is crucial for envelope impermeability and for full virulence in mice (69). Loss of *MmaA1* has been shown to enhance the virulence-associated cording phenotype of *M. tuberculosis* (66). One unresolved issue in the biosynthesis of MA is the step at which decoration is added to the MA mero chain; addition could accompany elongation by either FAS-II or, following synthesis, the full-length meromycolate chain. The former possibility is favored by previous reports that methyltransferases interact with subunits of the FAS-II complex (70, 71). The observation that *mmaA1* to -4 are clustered with the *hadABC* genes would also agree with the hypothesis of a functional coordination between methyltransferases and FAS-II. Moreover, it was recently shown that during macrophage infection by *M. bovis* BCG, the *hadABC* genes were the only ones contributing to the FAS-II complex to be regulated. Interestingly, this regulation was coordinated with that of the methyltransferase genes, arguing again for a close relationship between the HadABC enzymes and activity of the methyltransferases (72). Our observation that the regulation of both sets of genes—*mmaA2/mmaA3* and *hadABC*—is  $Rel_{Mtb}$  dependent further strengthens this relationship. Recently we have shown that mutations in the gene *hadC* influence the methyltransferase-dependent decoration profiles of meromycolate chains, reinforcing this hypothesis (our unpublished results).

There is a regulatory signaling cascade linking the two-component signal transduction system MprAB, the sigma factor SigE, and  $Rel_{Mtb}$ . Upon activation, the response regulator MprA directly upregulates *sigE*, which then directly stimulates expression of  $rel_{Mtb}$  (58, 73). Both *mprA* and *sigE* activate their own expression. Data from microarray analysis suggest additional positive feedback loops, with SigE upregulating *mprAB* (74) and  $Rel_{Mtb}$  activating its own expression (Table 1) (23, 24). The outcome of this complex regulatory circuit design is phenotypic heterogeneity, with two subpopulations expressing  $rel_{Mtb}$  at different levels (59, 60). This heterogeneity is part of a “bet-hedging strategy” contributing to the survival of the population (1). Our results, showing that  $Rel_{Mtb}$  might also negatively regulate the expression of both *mprB* and *sigE*, would therefore add two negative feedback loops to the positive feedback design of the *mprB-sigE-rel\_{Mtb}* circuit. These negative loops may contribute to turning off the MprBA-SigE- $Rel_{Mtb}$  signalization pathway once the stress is over.

For the MA biosynthesis genes whose regulation was partly or fully independent of  $Rel_{Mtb}$ , other transcription regulators must be involved. With the exception of the transcription activator FasR, which might contribute to the downregulation of its single target *fas* gene, neither MabR nor FadR, the two other well-characterized regulators, is likely to contribute to the regulation of the MA biosynthesis genes during starvation. Hence, further actors in the regulatory circuitry leading to global repression of MA synthesis genes during starvation remain to be identified.

Despite the downregulation of the MA biosynthesis genes, the

qualitative and quantitative profiles of the MAs were not affected after 96 h of starvation in either WT (see Fig. S5 in the supplemental material) or  $rel_{Mtb}$  (data not shown) strains, indicating that MAs are stable molecules. This result suggested that during starvation, the integrity of the mycomembrane would not be dramatically compromised by sparing the energy cost of synthesizing *de novo* MAs. The differential expression observed among the methyltransferase-encoding genes suggests that adaptation of the cell to starvation is mainly through subtle modifications of the meromycolic acid chains.

Following a comprehensive analysis of currently available actinobacterial genomes, we were able to draw an evolutionary scenario (Fig. 8) leading to the current organization of the locus encompassing *hadABC* and *mmaA1* to -4 in *Mycobacterium* species. The *hadA* and *hadB* genes have been found to be associated in all the genomes analyzed so far. Conservation of the gene order in distantly related species has been shown to result from a functional constraint and could be a fingerprint of physical interaction between the encoded proteins (75). This is certainly the case for *hadA* or *hadC* and *hadB*, which are cotranscribed and for which physical interactions between their products have been described—the active complexes are either HadA-HadB or HadB-HadC heterodimers (26). The analysis of the methyltransferase tree (see Fig. S4 in the supplemental material) leads to the conclusion that the presence at the locus of the four neighboring methyltransferase genes (*mmaA1* to -4) is due to their acquisition through three independent events rather than the result of successive duplication events from an ancestral inserted gene. This intriguing observation suggests that further investigation will reveal the identity of recombination insertion sites. Considering the numerous rearrangements that have occurred, it is likely that this locus is a recombination hot spot. However, the microsynteny observed in the pathogenic mycobacterium genomes suggests that a functional constraint acts at this locus to maintain the methyltransferase genes in the vicinity of the *hadABC* genes. This is in agreement with the fact that their gene products are involved in the same biosynthesis pathway. The efficiency of interaction between the Had and methyltransferase proteins previously reported (70, 71) would certainly benefit from such a genetic organization, since clustering of genes at the same locus would increase the local protein concentrations. Furthermore, this is consistent with our proposed evolutionary scenario, as the duplication of the *hadA/C* gene predated the acquisition of the first methyltransferase gene at the locus.

The issue that triggered the present study was determining the significance, if any, of the localization of the *had* genes downstream of genes involved in the translation process. We have demonstrated that this organization has allowed both types of genes to be coregulated by the SR. Although the driving force for the gene rearrangement in this region was probably the recombinogenic nature of the locus, the coregulation together with the subsequent acquisition of the methyltransferase genes might have imposed a selection pressure strong enough to shape and maintain the current organization at this locus.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Graham F. Hatfull for providing the mycobacterial recombinering system, Marcus A. Horwitz for the pGB9.2 plasmid, Brian D. Robertson for the pMIND plasmid, and Wladimir Malaga for the pJV53::hyg plasmid. We thank Ingrid Mercier, Alexandre Gouzy, Jeanne

Pilaire, Clément Carel, and Aïcha Bah for technical advice. We are grateful to Dave Lane for critical reading of the manuscript and to the members of the Daffé team for their constructive criticisms.

This work was supported by institutional grants from the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique). S.J. was supported by an MESR (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) fellowship.

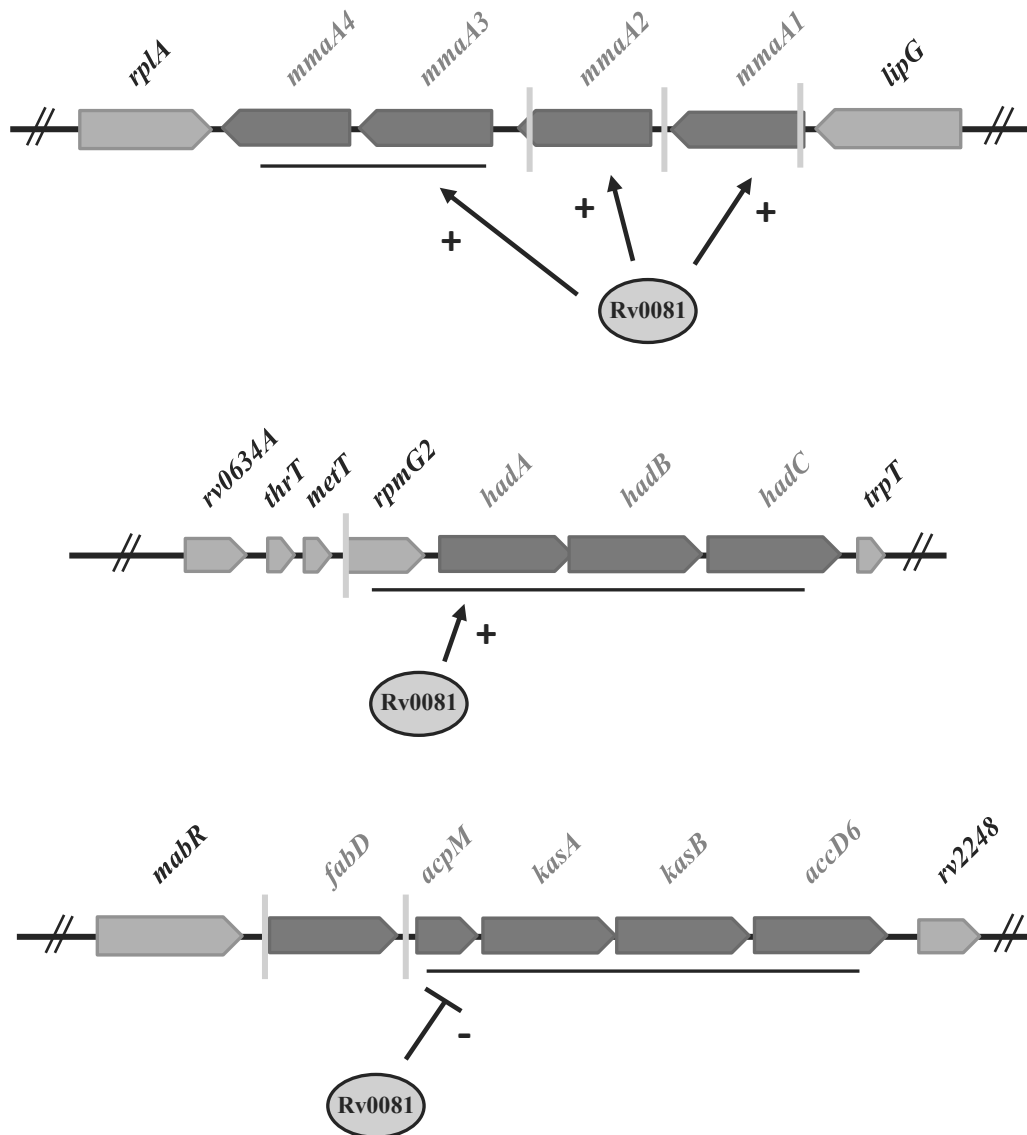
## REFERENCES

- Balaban NQ, Gerdes K, Lewis K, McKinney JD. 2013. A problem of persistence: still more questions than answers? *Nat Rev Microbiol* 11:587–591. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3076>.
- Gengenbacher M, Kaufmann SH. 2012. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev* 36:514–532. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x>.
- Young DB, Gideon HP, Wilkinson RJ. 2009. Eliminating latent tuberculosis. *Trends Microbiol* 17:183–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2009.02.005>.
- Falzon D, Jaramillo E, Wares F, Zignol M, Floyd K, Raviglione MC. 2013. Universal access to care for multidrug-resistant tuberculosis: an analysis of surveillance data. *Lancet Infect Dis* 13:690–697. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70130-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70130-0).
- Migliori GB, Sotgiu G, Gandhi NR, Falzon D, DeRiemer K, Centis R, Hollm-Delgado MG, Palmero D, Perez-Guzman C, Vargas MH, D'Ambrosio L, Spanevello A, Bauer M, Chan ED, Schaaf HS, Keshavjee S, Holtz TH, Menzies D. 2013. Drug resistance beyond extensively drug-resistant tuberculosis: individual patient data meta-analysis. *Eur Respir J* 42:169–179. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00136312>.
- Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, Ziazarifi AH, Hoffner SE. 2009. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. *Chest* 136:420–425. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.08-2427>.
- Daffe M. 2015. The cell envelope of tubercle bacilli. *Tuberculosis* 95(Suppl 1):S155–S158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.024>.
- Marrakchi H, Laneelle MA, Daffe M. 2014. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem Biol* 21:67–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.011>.
- Daffe M, Crick DC, Jackson M. 2014. Genetics of capsular polysaccharides and cell envelope (glyco)lipids. *Microbiol Spectr* 2:MGM2-0021-2013.
- Guenin-Mace L, Simeone R, Demangel C. 2009. Lipids of pathogenic mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. *Transbound Emerg Dis* 56:255–268. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1865-1682.2009.01072.x>.
- Jackson M, McNeil MR, Brennan PJ. 2013. Progress in targeting cell envelope biogenesis in Mycobacterium tuberculosis. *Future Microbiol* 8:855–875. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.13.52>.
- Favrot L, Ronning DR. 2012. Targeting the mycobacterial envelope for tuberculosis drug development. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10:1023–1036. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.12.91>.
- Neyrolles O, Guilhot C. 2011. Recent advances in deciphering the contribution of Mycobacterium tuberculosis lipids to pathogenesis. *Tuberculosis* (Edinb) 91:187–195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2011.01.002>.
- Goude R, Parish T. 2008. The genetics of cell wall biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. *Future Microbiol* 3:299–313. <http://dx.doi.org/10.2217/17460913.3.3.299>.
- Mondino S, Gago G, Gramajo H. 2013. Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in mycobacteria. *Mol Microbiol* 89:372–387. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12282>.
- Salzman V, Mondino S, Sala C, Cole ST, Gago G, Gramajo H. 2010. Transcriptional regulation of lipid homeostasis in mycobacteria. *Mol Microbiol* 78:64–77.
- Biswas RK, Dutta D, Tripathi A, Feng Y, Banerjee M, Singh BN. 2013. Identification and characterization of Rv0494: a fatty acid-responsive protein of the GntR/FadR family from Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology* 159:913–923. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.066654-0>.
- Provvedi R, Boldrin F, Falciani F, Palu G, Manganelli R. 2009. Global transcriptional response to vancomycin in Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology* 155:1093–1102. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.024802-0>.
- Boshoff HI, Myers TG, Copp BR, McNeil MR, Wilson MA, Barry CE, III. 2004. The transcriptional responses of Mycobacterium tuberculosis to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. *J Biol Chem* 279:40174–40184. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M406796200>.
- Hampshire T, Soneji S, Bacon J, James BW, Hinds J, Laing K, Stabler RA, Marsh PD, Butcher PD. 2004. Stationary phase gene expression of Mycobacterium tuberculosis following a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms? *Tuberculosis* 84:228–238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2003.12.010>.
- Rohde KH, Veiga DF, Caldwell S, Balazsi G, Russell DG. 2012. Linking the transcriptional profiles and the physiological states of Mycobacterium tuberculosis during an extended intracellular infection. *PLoS Pathog* 8:e1002769. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002769>.
- Colijn C, Brandes A, Zucker J, Lun DS, Weiner B, Farhat MR, Cheng TY, Moody DB, Murray M, Galagan JE. 2009. Interpreting expression data with metabolic flux models: predicting Mycobacterium tuberculosis mycolic acid production. *PLoS Comput Biol* 5:e1000489. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000489>.
- Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* 43:717–731. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02779.x>.
- Dahl JL, Kraus CN, Boshoff HI, Doan B, Foley K, Avarbock D, Kaplan G, Mizrahi V, Rubin H, Barry CE, III. 2003. The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of Mycobacterium tuberculosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10026–10031. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1631248100>.
- Wang Y, Barbacioru C, Hyland F, Xiao W, Hunkapiller KL, Blake J, Chan F, Gonzalez C, Zhang L, Samaha RR. 2006. Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics* 7:59. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-7-59>.
- Sacco E, Covarrubias AS, O'Hare HM, Carroll P, Eynard N, Jones TA, Parish T, Daffe M, Backbro K, Quemard A. 2007. The missing piece of the type II fatty acid synthase system from Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14628–14633. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0704132104>.
- Brown AK, Bhatt A, Singh A, Sapia E, Evans AF, Besra GS. 2007. Identification of the dehydratase component of the mycobacterial mycolic acid-synthesizing fatty acid synthase-II complex. *Microbiology* 153:4166–4173. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/012419-0>.
- Boutte CC, Crosson S. 2013. Bacterial lifestyle shapes stringent response activation. *Trends Microbiol* 21:174–180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.002>.
- Wolz C, Geiger T, Goerke C. 2010. The synthesis and function of the alarmone (p)ppGpp in firmicutes. *Int J Med Microbiol* 300:142–147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.017>.
- Potrykus K, Cashel M. 2008. (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* 62:35–51. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162903>.
- Cashel M, Gentry DR, Hernandez VJ, Vinella D. 1996. The stringent response, p 1458–1496. In Neidhardt FC, Curtiss R, III, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (ed), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC.
- Dalebroux ZD, Swanson MS. 2012. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nat Rev Microbiol* 10:203–212. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2720>.
- Primm TP, Andersen SJ, Mizrahi V, Avarbock D, Rubin H, Barry CE, 3rd. 2000. The stringent response of Mycobacterium tuberculosis is required for long-term survival. *J Bacteriol* 182:4889–4898. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.17.4889-4898.2000>.
- Dahl JL, Arora K, Boshoff HI, Whiteford DC, Pacheco SA, Walsh OJ, Lau-Bonilla D, Davis WB, Garza AG. 2005. The relA homolog of Mycobacterium smegmatis affects cell appearance, viability, and gene expression. *J Bacteriol* 187:2439–2447. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.7.2439-2447.2005>.
- Klinkenberg LG, Lee JH, Bishai WR, Karakousis PC. 2010. The stringent response is required for full virulence of Mycobacterium tuberculosis in guinea pigs. *J Infect Dis* 202:1397–1404. <http://dx.doi.org/10.1086/656524>.
- Karakousis PC, Yoshimatsu T, Lamichhane G, Woolwine SC, Nueremberger EL, Grosset J, Bishai WR. 2004. Dormancy phenotype displayed by extracellular Mycobacterium tuberculosis within artificial granulomas in mice. *J Exp Med* 200:647–657. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20040646>.

37. Weiss LA, Stallings CL. 2013. Essential roles for *Mycobacterium tuberculosis* Rel beyond the production of (p)ppGpp. *J Bacteriol* 195:5629–5638. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00759-13>.
38. van Kessel JC, Hatfull GF. 2007. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods* 4:147–152. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth996>.
39. Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
40. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
41. Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Omelchenko MV, Robertson CL, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Zheng C, Bryant SH. 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39:D225–229. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq1189>.
42. Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
43. Capella-Gutierrez S, Silla-Martinez JM, Gabaldon T. 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25:1972–1973. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>.
44. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321. <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
45. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27:1164–1165. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btr088>.
46. Sen A, Daubin V, Abrouk D, Gifford I, Berry AM, Normand P. 2014. Phylogeny of the class Actinobacteria revisited in the light of complete genomes; the orders 'Frankiales' and Micrococcales should be split into coherent entities; proposal of Frankiales ord nov, Geodermatophilales ord nov, Acidothermales ord nov and Nakamurellales ord nov *Int J Syst Evol Microbiol* 64:3821–3832.
47. Letunic I, Bork P. 2011. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* 39:W475–478. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr201>.
48. Cortes T, Schubert OT, Rose G, Arnvig KB, Comas I, Aebersold R, Young DB. 2013. Genome-wide mapping of transcriptional start sites defines an extensive leaderless transcriptome in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Rep* 5:1121–1131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.031>.
49. Newton-Foot M, Gey van Pittius NC. 2013. The complex architecture of mycobacterial promoters. *Tuberculosis (Edinb)* 93:60–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2012.08.003>.
50. Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Gutierrez C, Simoes N, Vincent V, Glaser P, Cole ST, Brosch R. 2004. Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial 'core' genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 150:483–496. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26662-0>.
51. Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM. 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* 29:231–262.
52. Kepes F. 2004. Periodic transcriptional organization of the *E. coli* genome. *J Mol Biol* 340:957–964. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.039>.
53. Zhang YJ, Ioerger TR, Huttenhower C, Long JE, Sassetti CM, Sacchetti JC, Rubin EJ. 2012. Global assessment of genomic regions required for growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 8:e1002946. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002946>.
54. Hauryliuk V, Atkinson GC, Murakami KS, Tenson T, Gerdes K. 2015. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol* 13:298–309. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3448>.
55. Choi KH, Kremer L, Besra GS, Rock CO. 2000. Identification and substrate specificity of beta-ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 275:28201–28207.
56. Jackson M, Raynaud C, Laneelle MA, Guilhot C, Laurent-Winter C, Ensergueix D, Gicquel B, Daffe M. 1999. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol Microbiol* 31:1573–1587. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01310.x>.
57. Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. 1997. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 276:1420–1422. <http://dx.doi.org/10.1126/science.276.5317.1420>.
58. Sureka K, Dey S, Datta P, Singh AK, Dasgupta A, Rodrigue S, Basu J, Kundu M. 2007. Polyphosphate kinase is involved in stress-induced mprAB-sigE-rel signalling in mycobacteria. *Mol Microbiol* 65:261–276. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05814.x>.
59. Sureka K, Ghosh B, Dasgupta A, Basu J, Kundu M, Bose I. 2008. Positive feedback and noise activate the stringent response regulator rel in mycobacteria. *PLoS One* 3:e1771. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001771>.
60. Ghosh S, Sureka K, Ghosh B, Bose I, Basu J, Kundu M. 2011. Phenotypic heterogeneity in mycobacterial stringent response. *BMC Syst Biol* 5:18. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-5-18>.
61. Hingley-Wilson SM, Sambandamurthy VK, Jacobs WR, Jr. 2003. Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol* 4:949–955. <http://dx.doi.org/10.1038/ni981>.
62. Gutierrez MC, Supply P, Brosch R. 2009. Pathogenomics of mycobacteria. *Genome Dyn* 6:198–210. <http://dx.doi.org/10.1159/000235772>.
63. Lacave C, Laneelle MA, Daffe M, Montrozier H, Laneelle G. 1989. Mycolic acid metabolic filiation and location in *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium phlei*. *Eur J Biochem* 181:459–466. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14747.x>.
64. Russell DG, VanderVen BC, Lee W, Abramovitch RB, Kim MJ, Homolka S, Niemann S, Rohde KH. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* wears what it eats. *Cell Host Microbe* 8:68–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.002>.
65. Shi L, Sohaskey CD, Pfeiffer C, Datta P, Parks M, McFadden J, North RJ, Gennaro ML. 2010. Carbon flux rerouting during *Mycobacterium tuberculosis* growth arrest. *Mol Microbiol* 78:1199–1215. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07399.x>.
66. Barkan D, Rao V, Sukenick GD, Glickman MS. 2010. Redundant function of cmaA2 and mmaA2 in *Mycobacterium tuberculosis* cis cyclopropanation of oxygenated mycolates. *J Bacteriol* 192:3661–3668. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00312-10>.
67. Rao V, Fujiwara N, Porcelli SA, Glickman MS. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J Exp Med* 201:535–543. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20041668>.
68. Corrales RM, Molle V, Leiba J, Mourey L, de Chastellier C, Kremer L. 2012. Phosphorylation of mycobacterial PcaA inhibits mycolic acid cyclopropanation: consequences for intracellular survival and for phagosome maturation block. *J Biol Chem* 287:26187–26199. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.373209>.
69. Dubnau E, Chan J, Raynaud C, Mohan VP, Laneelle MA, Yu K, Quemard A, Smith I, Daffe M. 2000. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol Microbiol* 36:630–637.
70. Cantaloube S, Veyron-Churlet R, Haddache N, Daffe M, Zerbib D. 2011. The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II dehydratases and methyltransferases define the specificity of the mycolic acid elongation complexes. *PLoS One* 6:e29564. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029564>.
71. Veyron-Churlet R, Guerrini O, Mourey L, Daffe M, Zerbib D. 2004. Protein-protein interactions within the fatty acid synthase-II system of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for mycobacterial viability. *Mol Microbiol* 54:1161–1172. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04334.x>.
72. Rienksma RA, Suarez-Diez M, Mollenkopf HJ, Dolganov GM, Dorhoi A, Schoolnik GK, Martins Dos Santos V, Kaufmann S, Schaap PJ, Gengenbacher M. 2015. Comprehensive insights into transcriptional adaptation of intracellular mycobacteria by microbe-enriched dual RNA sequencing. *BMC Genomics* 16:34. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-014-1197-2>.
73. Manganelli R. 2007. Polyphosphate and stress response in mycobacteria.

- Mol Microbiol 65:258–260. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05819.x>.
74. Manganelli R, Voskuil MI, Schoolnik GK, Smith I. 2001. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. Mol Microbiol 41:423–437. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02525.x>.
75. Dandekar T, Snel B, Huynen M, Bork P. 1998. Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact. Trends Biochem Sci 23:324–328. [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01274-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01274-2).
76. Mao F, Dam P, Chou J, Olman V, Xu Y. 2009. DOOR: a database for prokaryotic operons. Nucleic Acids Res 37:D459–D463. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn757>.
77. World Health Organization. 2014. Global tuberculosis report 2014. World Health Organization, Geneva, Switzerland.





**Figure 25. Les gènes de biosynthèse des AMs potentiellement régulés directement par Rv0081.**

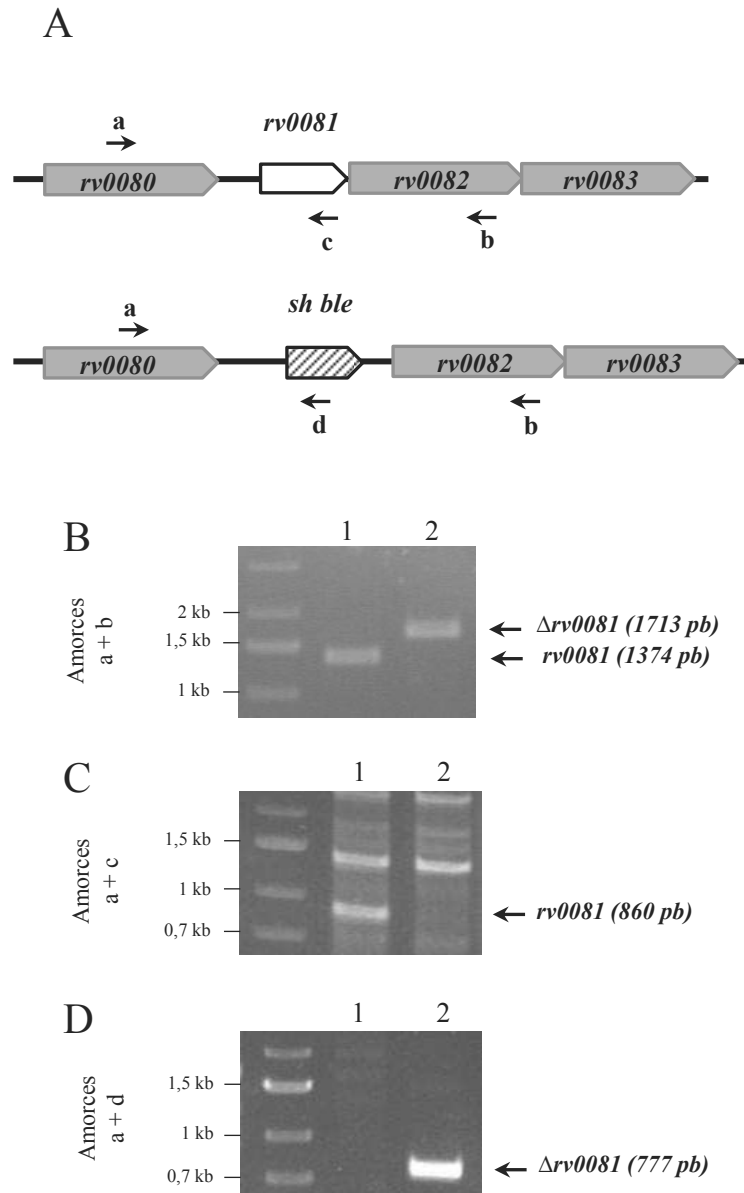
Les sites de fixation de Rv0081 mis en évidence par Chip-Seq sont symbolisés par un trait vertical jaune. L'effet de la surproduction de Rv0081 sur l'expression des gènes cibles potentiels est symbolisé par un + lorsqu'il s'agit d'une activation, et d'un - pour une répression. Ce schéma est basé sur les données disponibles sur la plateforme TBDB (<http://www.tbdb.org/>).

### III. Etude du rôle biologique du régulateur transcriptionnel Rv0081 chez *M.tuberculosis*

#### A. Hypothèse de travail

Le 3<sup>ème</sup> volet de ma thèse avait pour but d'identifier et de caractériser de nouveaux régulateurs transcriptionnels des gènes de biosynthèse des AMs, avec pour ambition **(i)** la mise en évidence de possibles réseaux de régulation permettant de relier la biosynthèse des AMs à d'autres fonctions cellulaires, **(ii)** de contribuer à apporter de nouvelles connaissances sur la physiologie du bacille mais également **(iii)** de conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Depuis peu, la plateforme Tuberculosis Database [TBDB (Reddy et al., 2009)] a publié des données de Chip-seq de 154 des régulateurs transcriptionnels de *M.tb* (<http://www.tbdb.org/>), ce qui représente environ 80% des facteurs de transcription prédits chez *M.tb* (Galagan et al., 2013; Minch et al., 2015). Ces données ont ensuite été combinées avec les données d'expression associées à la surexpression de ces mêmes régulateurs, donnant des indications sur les gènes dont l'expression est potentiellement contrôlée de manière directe par ces régulateurs. En se basant sur ces études, le régulateur Rv0081 nous a particulièrement intéressés, pour trois raisons. Premièrement, l'étude de Rv0081 pourrait donner une vision intégrée de la régulation de la biosynthèse des AMs, car le régulateur contrôle potentiellement l'expression de ~ 1350 gènes dont plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse des AMs (**Figure 25**). Deuxièmement, l'intégration de l'ensemble des données issues des analyses globales a conduit à la prédiction que Rv0081 serait au cœur d'un réseau de régulation impliquant plusieurs fonctions cellulaires, suggérant par conséquent un rôle capital du régulateur dans la physiologie et l'adaptation de *M.tb* (Galagan et al., 2013) [voir **Introduction § II, D, a)**]. Enfin, le gène *rv0081* est autorégulé négativement et est activé par les systèmes de transduction du signal à deux composants MprAB et DosRS-DosT (He et al., 2011), qui jouent des rôles importants dans la physiologie, la capacité adaptative et la virulence de *M.tb* [voir **Introduction § II, D, a) et § II, D, b) iii)**]. Cela suggère que suite à des signaux environnementaux différents, un même programme génétique orchestré par Rv0081 permettrait l'adaptation de la bactérie. A l'heure actuelle, il existe peu de données sur ce régulateur. Il appartient à la famille ArsR/SmtB dont l'activité est dépendante d'un métal (Campbell et al., 2007). Le gène est conservé chez plusieurs espèces mycobactérienne, mais



**Figure 26. Construction du mutant  $\Delta rv0081$  chez *M.tb* par “recombineering”. (A)** Représentation de l’organisation génétique de la souche *Wt* et le remplacement du gène *rv0081* par la cassette de résistance à la zéocine (gène *sh ble*). Les amorces utilisées (a, b, c, d) pour confirmer la délétion par PCR d’un clone sont représentées. La vérification par PCR met en évidence : (B) le remplacement de *rv0081* par la cassette de résistance à la zéocine; (C), la confirmation de l’absence d’un allèle sauvage *rv0081* chez la souche mutante  $\Delta rv0081$ ; et (D) la présence de la cassette de résistance chez la souche mutante  $\Delta rv0081$ . Piste 1 : souche *Wt*; Piste 2 : mutant  $\Delta rv0081$ .

pas chez *M.leprae*. En accord avec cette donnée, *rv0081* n'est pas essentiel *in vitro* pour la viabilité de *M.tb* (He et al., 2011).

Plus précisément, l'objectif de cette étude a été double : **(i)** déterminer si Rv0081 est un régulateur contrôlant l'expression des gènes de biosynthèse des AMs présentés dans la **figure 25** (*hadABC*, opéron *fas-II*, *mmaA1-4*), et **(ii)** évaluer le rôle de ce régulateur dans la physiologie de *M.tb* *in vitro* et au cours de l'infection.

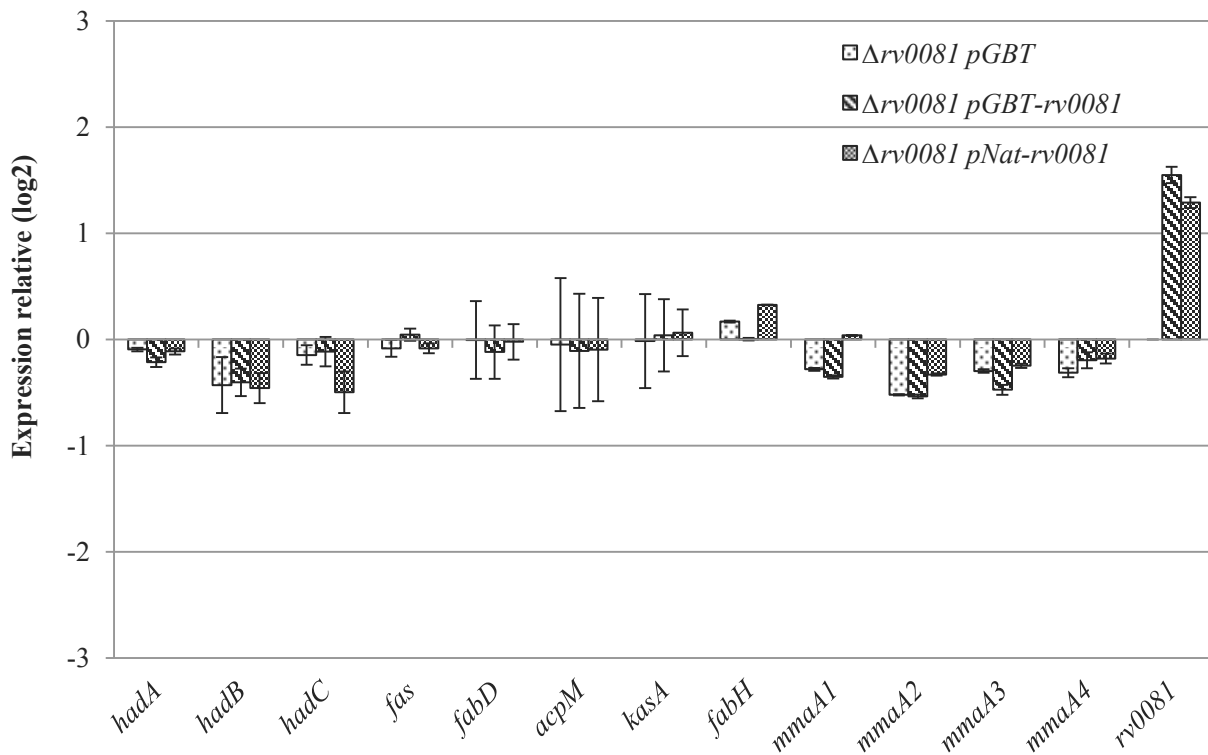
## B. Résultats

Afin de pouvoir évaluer le rôle biologique de *rv0081* chez *M.tb*, le mutant de délétion  $\Delta rv0081$  a été construit en utilisant le système de « recombineering » développé par van Kessel et collaborateurs (van Kessel and Hatfull, 2007; van Kessel et al., 2008). Cette méthode repose sur l'utilisation d'un plasmide exprimant deux protéines phagiques (Gp60 et Gp61, homologues respectifs de RecE et RecT du phage lambda de *E.coli*) qui stimulent la recombinaison homologue permettant l'échange entre l'allèle sauvage chromosomique et une cassette de résistance bornée (conférant ici la résistance à la zéocine). La délétion a été vérifiée par PCR sur des lysats cellulaires (**Figure 26**).

Deux plasmides différents exprimant l'allèle sauvage *rv0081* ont été également construits pour compléter la souche mutante. Pour l'un, *rv0081* est exprimé à partir d'un promoteur inductible à la tétracycline (pGBT-*rv0081*), pour l'autre, à partir de ses signaux d'expression naturels (pNat-*rv0081*). Cette stratégie a été adoptée pour permettre d'observer les éventuelles conséquences de l'absence d'une régulation naturelle du gène *rv0081* chez *M.tb*. Les deux vecteurs utilisés sont dérivés du pGB9.2 (Harth et al., 2004), un vecteur à bas nombre de copies chez les mycobactéries.

### a) Rv0081 ne contribue pas à l'expression des gènes de biosynthèse des AMs en phase exponentielle de croissance

Pour déterminer si Rv0081 est un régulateur transcriptionnel des gènes *hadABC*, de l'opéron *fas-II* et des gènes *mmaA1-4*, l'expression relative de ces gènes en phase exponentielle de croissance entre les souches *Wt* (*Wt pGBT*) et mutante ( $\Delta rv0081$  *pGBT*) a été déterminée. Les résultats sont présentés dans la **Figure 27**. L'expression des gènes *hadABC*, *mmaA1-4* et de l'opéron *fas-II* (*fabD*, *acpM*, *kasA*) n'est pas sensiblement affectée chez le mutant  $\Delta rv0081$ . La légère surexpression de *rv0081* chez les deux souches complémentées n'a



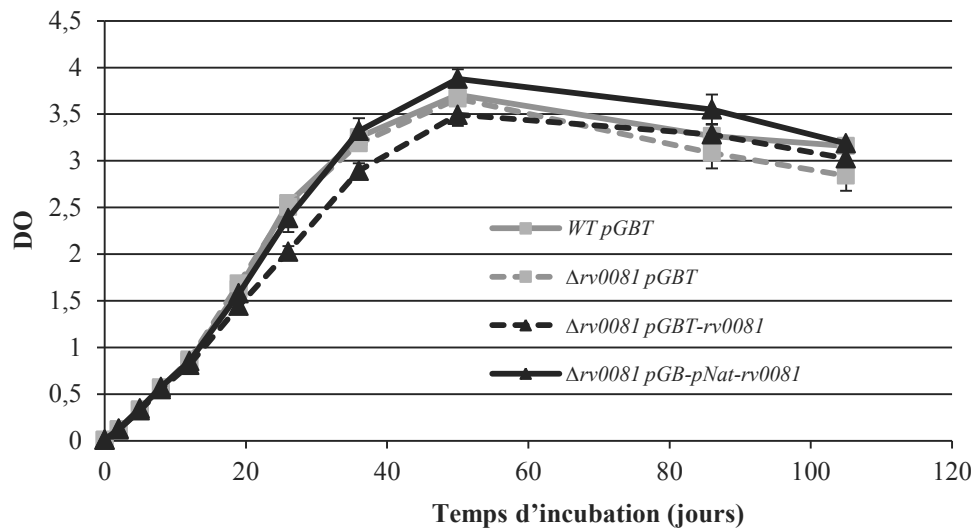
**Figure 27. Effet de la délétion de *rv0081* sur l'expression de plusieurs gènes de biosynthèse des AMs.** La souche *Wt* (*Wt* pGBT), le mutant  $\Delta rv0081$  ( $\Delta rv0081$  pGBT), et des deux souches mutantes complémentées ( $\Delta rv0081$  pGBT-*rv0081*,  $\Delta rv0081$  pNat-*rv0081*) ont été cultivées en milieu 7H9 (supplémenté par de l'ADC, du glycérol, du tween, et de la tétracycline 20ng/mL) jusqu'en phase exponentielle. L'analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes a été réalisée suivant la procédure décrite précédemment dans l'article p. 71 (Jamet et al, soumis). Les valeurs pour la souche mutante, et les deux souches complémentées sont exprimés en ratio des valeurs de la souche *Wt*. Les données ont été transformées en log<sub>2</sub>, et les barres d'erreurs représentent les erreurs standards à la moyenne à partir de trois réplicas biologiques.

pas non plus d'effet majeur sur l'expression des gènes. Donc en phase exponentielle de croissance, Rv0081 ne contribue pas à l'expression de ces gènes. Cependant, Rv0081 appartenant à la famille ArsR/SmtB dont l'activité est dépendante d'un métal, la présence d'un métal spécifique dans le milieu de culture utilisé (7H9) pourrait inhiber la fixation de Rv0081 aux ADNs cibles. En effet ce type de régulateurs, en l'absence de leurs métaux spécifiques, inhibe l'expression de leurs gènes cibles par fixation à une séquence opératrice bloquant l'accès à l'ARN polymérase. A l'inverse, la présence de leurs métaux spécifiques inhibe la fixation conduisant à la dépression des gènes cibles (Osman and Cavet, 2010). A l'heure actuelle, il n'existe aucune donnée concernant la dépendance (ou non) de l'activité de Rv0081 à un ou plusieurs métaux (He et al., 2011). Le milieu de culture 7H9, utilisé pour les analyses d'expression génique, est composé de plusieurs métaux, dont deux sont décrits pour être reconnus par des régulateurs de la famille ArsR/SmtB : le cuivre et le zinc (Osman and Cavet, 2010). S'agissant de deux métaux non essentiels à la viabilité de *M.tb* (Ojha et al., 2008; Ward et al., 2010), pour tester l'hypothèse de l'inhibition de la fixation de Rv0081 par le cuivre et/ou le zinc, nous avons mesuré l'expression des gènes dans un milieu dépourvu de cuivre et de zinc (milieu Sauton non additionné de zinc). Aucune différence n'a été observée (données non montrées). L'ensemble de ces données ne permet pas de conclure quant à la dépendance (ou non) de Rv0081 à un métal, mais suggère que ce régulateur ne contrôle pas l'expression des gènes *hadABC*, *mmaA1-4* et de l'opéron *fas-II*. En accord avec cette hypothèse, aucune différence concernant les proportions relatives des différentes espèces d'AMs (par HPTLC) et leur structures (par MALDI-TOF) n'a été observée entre les différentes souches, cultivées en milieux 7H9 et en Sauton (expérimentations réalisées par **F. Laval** dans le groupe, données non montrées).

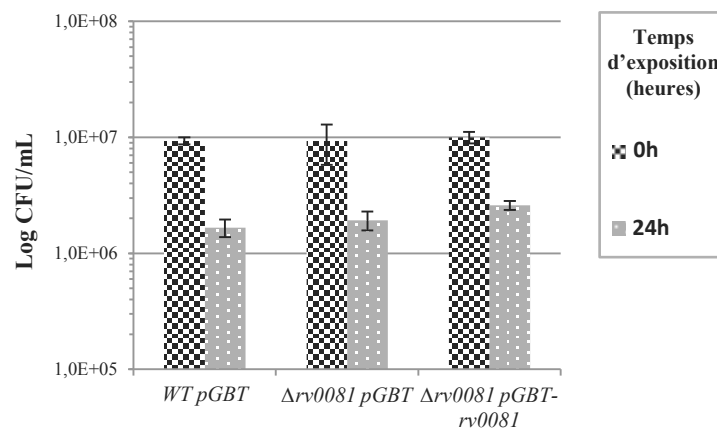
#### **b) Rv0081 n'a pas d'impact fort sur la physiologie de *M.tuberculosis in vitro***

La position centrale supposée de Rv0081 dans le réseau de régulation proposé par Galagan et collaborateurs pouvait suggérer un rôle important de ce régulateur dans la physiologie de la bactérie (Galagan et al., 2013). Afin de tester cette prédiction et de préciser le rôle biologique de Rv0081, nous avons entrepris une analyse phénotypique du mutant *Δrv0081*.

***L'inactivation de rv0081 n'affecte ni le profil de croissance ni la sensibilité au stress oxydatif et aux antibiotiques in vitro.*** Comme montré sur le **Figure 28**, le profil de croissance des différentes souches était très similaire, atteignant la même DO en phase stationnaire et



**Figure 28. Rv0081 n'est pas nécessaire pour la croissance de *M.tb* *in vitro*.** La croissance des différentes souches cultivées en milieu 7H9 [supplémenté par de l'ADC, du glycérol, du tween, de la kanamycine (25µg/mL) et de la tétracycline (20ng/mL)] a été suivie par DO. Les barres d'erreurs représentent les écarts types de trois répliques biologiques.



**Figure 29. Rv0081 n'est pas impliquée dans la résistance au stress oxydatif.** Des cultures en phase exponentielle de croissance ont été ajustées à DO 0,1 dans du milieu 7H9 [supplémenté par de l'ADC, du glycérol, du tween, de la kanamycine (25µg/mL) et de la tétracycline (20ng/mL)], puis traitées par de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10mM). Le nombre de cellules viables après 24H de traitement a été estimé par CFUs. Les barres d'erreurs représentent les écarts types de trois répliques biologiques.

avec la même vitesse de croissance. Ce résultat indiquait donc que Rv0081 ne contribuait pas à la croissance bactérienne dans ces conditions. Pour tester la contribution de Rv0081 à la réponse au stress oxydatif, la viabilité des différentes souches soumises à 10 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 24H a été estimée. La même perte de viabilité d'1 log a été observée pour l'ensemble des souches indiquant que Rv0081 ne contribuait pas à la réponse au stress oxydatif (**Figure 29**). Nous avons également testé le niveau de sensibilité du mutant à différentes drogues dont des antituberculeux. Parmi ceux-ci, quatre ciblent les enzymes de biosynthèse des AMs (Ethionamide, Isoniazide, Thiolactomycine, Isoxyl), un la biosynthèse de l'AG (Ethambutol), et un l'ARN polymérase (Rifampicine). Les concentrations minimales d'inhibition (MIC) pour ces drogues ont été les mêmes que celles de la *Wt*, indiquant que Rv0081 ne contribuait pas à la réponse à ces drogues (**Figure 30**).

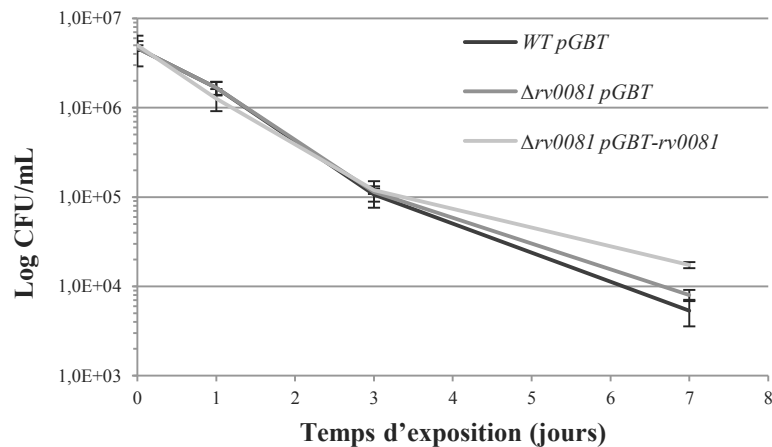
***Rv0081 ne contribue pas au développement de l'état de persistance in vitro.*** Un des problèmes majeurs associés à la lutte contre la tuberculose est la capacité de la bactérie à se différencier dans un état physiologique réversible de tolérance aux antibiotiques. Ces bactéries qui sont dans un état de quasi-dormance sont appelées « persisters » et sont opérationnellement définies comme étant des cellules qui survivent à une exposition prolongée à un ou plusieurs antibiotiques (Balaban et al., 2004, 2013). Le régulon « Dos » étant impliqué dans le développement de l'état de dormance et *rv0081* faisant partie des 49 cibles régulées directement par DosR, nous avons testé spécifiquement sa contribution à l'apparition des persisters *in vitro*. Les différentes souches ont été cultivées en présence d'une forte concentration d'INH pendant 7 jours et la proportion de cellules vivantes (les persisters) a été déterminée par CFU. Comme montré sur la **Figure 31**, l'évolution du nombre de persisters pour l'ensemble des souches a été la même, passant de  $\sim 3 \times 10^6$  au temps 0 à  $\sim 10^4$  au 7<sup>ème</sup> jour. Par conséquent, Rv0081 n'a pas contribué à l'apparition de l'état de persistance dans ces conditions expérimentales.

***Rv0081 ne contribue pas à la barrière de perméabilité.*** L'expression de *rv0081* est activée par les systèmes à deux composants MprAB et DosR/ST (He et al., 2011). Ces deux systèmes sont impliqués dans l'adaptation de *M.tb* à plusieurs stress [pour revue (Bretl et al., 2011)]. L'inactivation du système MprAB conduit à une augmentation de la résistance de *M.tb* au SDS (Pang et al., 2007), un phénotype associé à une altération de la perméabilité de la mycomembrane (Nikaido and Vaara, 1985). Pour connaître la contribution de Rv0081 à l'altération du niveau de sensibilité des mutants *mprAB* au SDS, nous avons évalué la sensibilité du mutant  $\Delta rv0081$  à ce détergent. Les cultures ont été exposées pendant 11 jours à



	Ethambutol	Ethionamide	Isoniazide	Thyolactomycine	Hygromycine	Rifampicine	Isoxyl
<i>WT pGBT</i>	5µg.mL <sup>-1</sup>	1,56µg.mL <sup>-1</sup>	0,1µg.mL <sup>-1</sup>	25µg.mL <sup>-1</sup>	1,56µg.mL <sup>-1</sup>	0,8µg.mL <sup>-1</sup>	5µg.mL <sup>-1</sup>
<i>Δrv0081 pGBT</i>	5µg.mL <sup>-1</sup>	1,56µg.mL <sup>-1</sup>	0,1-0,2µg.mL <sup>-1</sup>	25µg.mL <sup>-1</sup>	1,56-3,12µg.mL <sup>-1</sup>	0,8µg.mL <sup>-1</sup>	5µg.mL <sup>-1</sup>
<i>Δrv0081 pGBT-rv0081</i>	5µg.mL <sup>-1</sup>	1,56µg.mL <sup>-1</sup>	0,1µg.mL <sup>-1</sup>	25µg.mL <sup>-1</sup>	1,56µg.mL <sup>-1</sup>	0,8µg.mL <sup>-1</sup>	5µg.mL <sup>-1</sup>
<i>Δrv0081 pNat-rv0081</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5µg.mL <sup>-1</sup>

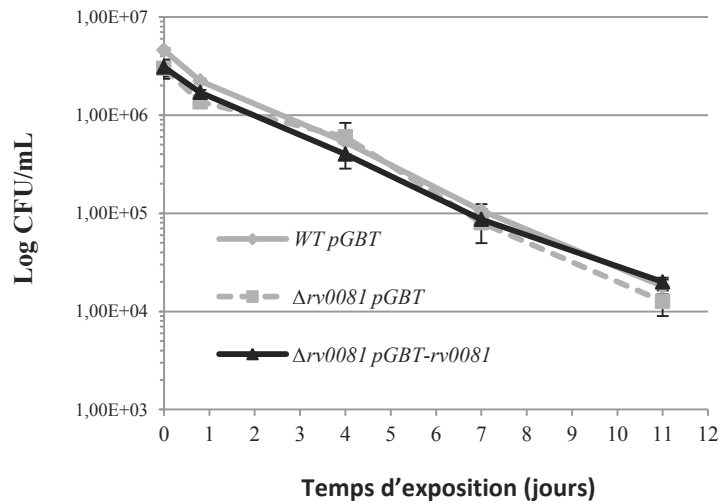
**Figure 30. La délétion de *rv0081* n'affecte pas la sensibilité aux drogues de *M.tb*.** La sensibilité aux drogues a été évaluée en suivant la procédure développée précédemment par Deraeve, et al (2011), qui est une méthode basée sur un test colorimétrique de la réduction du diphenyl-tetrazolium bromide (MTT). La sensibilité aux drogues est exprimée en concentration minimale inhibitrice (MIC). nd : non déterminé.



**Figure 31. *Rv0081* n'est pas impliquée dans la formation de cellules persistantes.** Des cultures en phase exponentielle de croissance ont été ajustées à DO 0,05 dans du milieu 7H9 [supplémenté par de l'ADC, du glycérol, du tween, de la kanamycine (25µg/mL) et de la tétracycline (20ng/mL)], puis traitées par une forte dose d'isoniazide (cinq fois la MIC, soit 0,5µg/mL) pendant 7 jours. Le nombre de cellules viables a été comptabilisé au cours du temps par CFUs. Les barres d'erreurs représentent les écarts types de trois répliques biologiques.

0.1% de SDS et à différents temps le taux de survie mesuré par estimation des CFUs. Comme indiqué sur la **Figure 32**, le taux de survie, pour l'ensemble des souches a diminué graduellement avec la même cinétique (jusqu'à 1%). Ces données montrent que l'inactivation de Rv0081 n'a pas affecté la réponse au SDS, suggérant que Rv0081 ne contribue pas à la barrière de perméabilité de la mycomembrane et donc que, bien qu'appartenant au régulon MprAB, Rv0081 ne contribue pas à la sensibilité des bactéries au SDS à travers la voie MprAB-dépendante. En accord avec cette donnée, le mutant *rv0081* a gardé le phénotype « d'acid-fast staining » indiquant que les propriétés de son enveloppe n'ont pas été altérées de manière significative (données non montrées). Egalement de manière cohérente, l'analyse par RT-qPCR de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de divers lipides de l'enveloppe, incluant les PAT/DAT, PGL, PDIM, SL-1, n'a révélé aucune différence d'expression entre le mutant et le *Wt* en phase exponentielle de croissance (données non montrées).

***Rv0081 ne contribue pas à la réponse adaptative à l'hypoxie et à la ré-aération.*** En accord avec son induction par l'hypoxie, le système DosR/ST joue un rôle important dans la survie des mycobactéries lors d'une déplétion progressive en O<sub>2</sub> [voir **Introduction § II, D, a)**]. Rv0081 est le seul régulateur appartenant au régulon Dos et est prédit pour être un régulateur global. Sur la base de ces observations, Galagan et collaborateurs ont proposé que Rv0081 soit impliqué avec l'ensemble du régulon DosR à la mise en place de la réponse adaptative à l'hypoxie (Galagan et al., 2013). Nous avons testé expérimentalement cette hypothèse. Pour cela, les taux de survie pendant 60 jours du mutant *rv0081* cultivé sans agitation dans des tubes étanches aux gaz ont été mesurés. L'addition de bleu de méthylène dans la culture a indiqué qu'après 17 jours de culture les cellules étaient en hypoxie (**Figure 33**). C'est également à ce moment-là que les taux de survie ont commencé à fortement chuter jusqu'à n'être plus que de 0.001% à 60 jours. Cependant la cinétique a été la même pour l'ensemble des souches incluant les souches exprimant *rv0081* sous son promoteur naturel (*wt* et  $\Delta$ *rv0081 pNAT*) ou un promoteur synthétique ( $\Delta$ *rv0081 pGBT-rv0081*). Donc à l'intérieur du régulon Dos, Rv0081 n'est pas impliqué dans la réponse adaptative à l'hypoxie dans ces conditions expérimentales. DosR chez *M.tb* étant aussi nécessaire pour sortir de l'état de dormance induit par l'hypoxie (Leistikow et al., 2010), nous avons également testé la contribution éventuelle de Rv0081 à la reprise de croissance après ré-aération. Comme indiqué sur le **Figure 33**, les courbes de reprise de croissances ont été les mêmes pour l'ensemble des souches, indiquant que Rv0081 ne jouait aucun rôle dans la capacité à repartir en croissance après ré-aération.

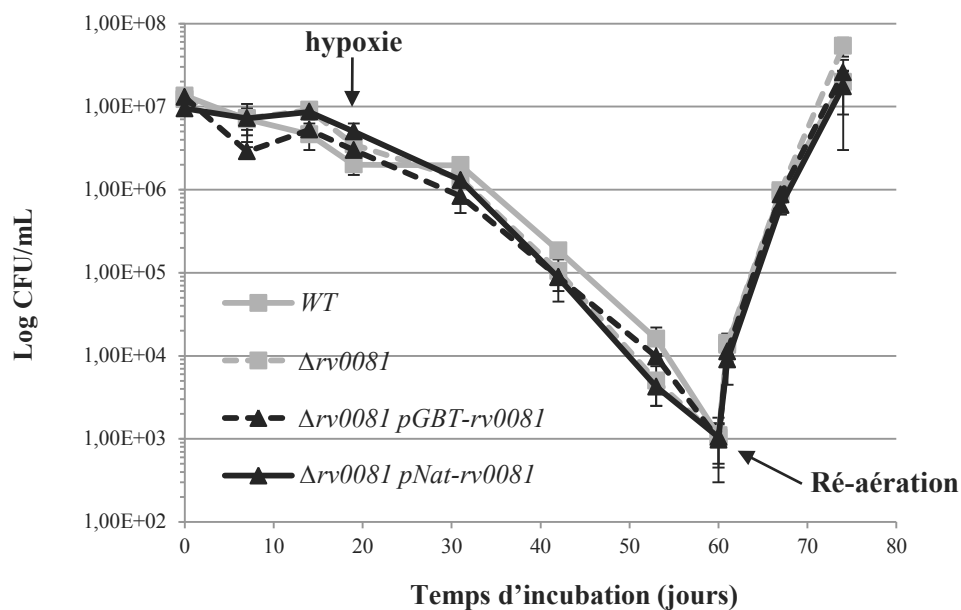


**Figure 32. Rv0081 n'est pas impliquée dans la résistance au détergent.** Des cultures en phase exponentiel de croissance ont été ajustées à DO 0,05 dans du milieu 7H9 [supplémenté par de l'ADC, du glycérol, du tween, de la kanamycine (25μg/mL) et de la tétracycline (20ng/mL)], puis traitées par du SDS (0,1% final) pendant 11 jours. Le nombre de cellules viables a été comptabilisé au cours du temps par CFUs. Les barres d'erreurs représentent les écarts types de trois répliques biologiques.

L'ensemble de ces données a montré que, dans les conditions expérimentales utilisées, le régulateur Rv0081 n'avait pas de rôle majeur sur la physiologie de *M.tb in vitro*. Par ailleurs, l'observation que Rv0081 n'était impliqué ni dans le niveau de sensibilité au SDS, ni dans l'adaptation à l'hypoxie et ni dans la ré-aération, suggérait que Rv0081, bien qu'appartenant aux régulons MprAB et DosR/ST n'est pas un élément majeur de ces systèmes pour l'adaptation de la bactérie à ces stress.

### **c) La perte et la dérégulation de *rv0081* modifient la réponse adaptative de *M.tuberculosis* à l'intérieur des macrophages**

Un phénotype d'hypervirulence a été rapporté pour un mutant *mprA*, c'est-à-dire une multiplication plus efficace du mutant au sein du macrophage (Pang et al., 2007; Zahrt and Deretic, 2001). Comme *rv0081* est directement régulé par ce régulateur de réponse, nous avons testé la contribution de Rv0081 à la réponse adaptative de *M.tb* dans le modèle de macrophages THP-1. C'est une lignée cellulaire de monocytes humains qui peut être différenciée en macrophages, par le traitement avec des esters de phorbol (Tsuchiya et al., 1982). La multiplication bactérienne dans les macrophages a été suivie au cours du temps après infection (**Figure 34**). Jusqu'à 7 jours d'infection, la cinétique de croissance du mutant ( $\Delta rv0081$  *pGBT*) n'était pas significativement différente de celle de la souche *Wt* (*Wt pGBT*). Entre 7 et 8 jours, de manière remarquable, la charge bactérienne dans les macrophages infectés par la souche *Wt* est restée stable alors que celle du mutant  $\Delta rv0081$  a continué d'augmenter. Ce phénotype a été complètement complémenté par le plasmide exprimant *rv0081* à partir de ses signaux naturels ( $\Delta rv0081$  *pNat-rv0081*) indiquant que c'est bien l'inactivation de *rv0081* qui était responsable du phénotype d'hypervirulence du mutant  $\Delta rv0081$ . Ce résultat suggérait donc que le phénotype d'hypervirulence observé pour le mutant *mprA* pourrait être dû à l'impossibilité chez ce mutant d'activer l'expression de *rv0081* au cours de l'infection. De manière intéressante, la cinétique de croissance de la souche mutante exprimant *rv0081* à partir du promoteur exogène TetR ( $\Delta rv0081$  *pGBT-rv0081*) a été similaire à celle de la souche *Wt* jusqu'à 7 jours, mais entre le 7<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour post-infection, la charge bactérienne des macrophages infectés par cette souche a sensiblement chuté (diminution d'un facteur ~4,5). Cette chute de la charge bactérienne n'étant pas observée pour la souche  $\Delta rv0081$  *pNat-rv0081* suggérait que l'incapacité à réguler *rv0081* correctement pendant le processus d'infection, empêchait la mise en place d'une réponse adaptative permettant la survie de *M.tb* dans les macrophages. L'ensemble de ces



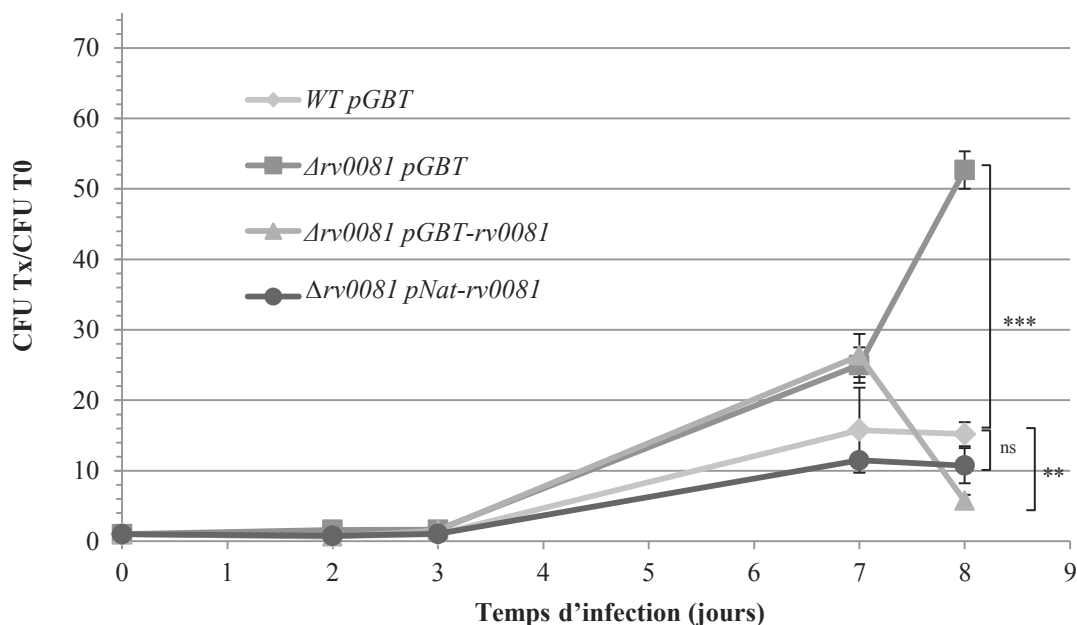
**Figure 33. Rv0081 n'est pas impliquée dans l'adaptation à l'hypoxie et la reprise de croissance après ré-aération.** Des cultures en phase exponentielle de croissance ont été ajustées à DO 0,1 dans du milieu Dubos [supplémenté par de l'Albumine, du tween, de la kanamycine (25µg/mL) et de la tétracycline (20ng/mL)]. Des dilutions en série ont été réalisées et réparties dans des tubes de hungate de 15mL (Dutscher), à raison de 14mL de préparations bactériennes par tube, puis incubées sans agitation. Le nombre de cellules viables a été comptabilisé au cours du temps par CFUs. Les barres d'erreurs représentent les écarts types de trois répliques biologiques. La 1<sup>ère</sup> flèche indique le temps de la consommation complète de l'oxygène révélée par la décolorisation complète d'un indicateur (le bleu de méthylène) dans des tubes contrôles. La ré-aération est indiquée avec la seconde flèche correspondant au temps où chaque tube a été ouvert, pour assurer les échanges gazeux et permettre la reprise de croissance.

données suggérait donc que Rv0081 et le contrôle de son expression étaient des éléments impliqués dans la virulence de *M.tb*.

#### **d) Discussion**

Les données issues d'approches systémiques ont désigné Rv0081 comme étant un régulateur global (plus de 1000 gènes cibles) central pour la capacité adaptative de *M.tb* (Galagan et al., 2013). En accord avec cette prédiction, nous avons montré que l'inactivation de Rv0081 et/ou une expression non adéquate du gène affectaient la croissance de la bactérie à l'intérieur des macrophages. Cependant, ni les mesures d'expression des gènes, ni les tests de sensibilité à différents stress réalisés *in vitro* n'ont confirmé une activité de régulation sur l'expression des gènes de biosynthèse des lipides, incluant les AMs et sur une implication de Rv0081 en réponse à ces stress. Comment expliquer ces résultats et réconcilier ceux à priori contradictoires ? Des éléments de réponse peuvent être trouvés en considérant à la fois la manière dont le gène *rv0081* est régulé (He et al., 2011) et la cinétique d'expression du gène au cours du processus infectieux (Rohde et al., 2012).

La contribution respective des régulateurs DosR, MprA et Rv0081 à réguler directement l'expression de *rv0081* a été disséquée par He et al (2011) et le modèle suivant a été proposé. Le gène *rv0081* est exprimé à partir de deux promoteurs. En l'absence de stimuli, l'expression de *rv0081* est faible car la concentration des formes phosphorylées de DosR et MprA au sein de la cellule, les formes actives de ces deux régulateurs, est faible. Lorsque le système Dos est activé, l'expression de *rv0081* augmente grâce au promoteur proximal P1. De même, dans des conditions qui activent le système MprAB, l'expression de *rv0081* augmente à partir du promoteur distal P2. Lorsque les deux systèmes sont activés, l'expression de *rv0081* augmentera à partir de P1 et P2. L'accumulation de Rv0081 à terme, va s'auto-réprimer en agissant sur P1. Indépendamment des systèmes Dos et MprA, en réponse à des stimuli spécifiques, Rv0081 peut se dissocier du promoteur P1 permettant son expression à partir des deux promoteurs P1 et P2 (He et al., 2011). Ce schéma de régulation implique qu'en absence de stimulation, du fait de l'auto-répression, il y a très peu de Rv0081 dans la cellule. Ceci est en accord avec les travaux de Fu et Fu-Liu (2007) qui ont mesuré le niveau d'expression de l'ensemble des gènes de *M.tb* cultivé en phase exponentielle de croissance (Fu and Fu-Liu, 2007). Ces données peuvent expliquer pourquoi l'inactivation de *rv0081* dans des cultures en phase exponentielle n'ait pas eu d'impact sur l'expression des gènes cibles ou sur la réponse à différents stress. Les études systémiques montrant un effet de la



**Figure 34. La perte et la dérégulation de *rv0081* modifie la réponse adaptative de *M.tb* à l'intérieur des macrophages.** Les cellules de la lignée de monocytes humains THP-1 ont été cultivées dans du milieu RPMI (Dubnau et al., 2000). Ces cellules ont été réparties dans des plaques 24 puits ( $5 \times 10^5$  cellules/puits) puis différenciées en macrophages par un traitement de 24H avec un ester de phorbol, le PMA (20ng/mL) (Tsuchiya et al., 1982). Les infections ont ensuite été réalisées selon la procédure décrite dans Dubnau et al., (2000) avec quelques modifications. Brièvement, les cultures bactériennes en phase stationnaire ont été diluées dans du milieu RPMI à une concentration de  $1 \times 10^6$  CFU/mL, et les infections réalisées en triplicats (à une multiplicité d'infection de 1 CFU par macrophage). Après 1,5 heures, les surnageants ont été éliminés, les cellules lavées avec du milieu RPMI, puis incubées 1,5 heures avec du milieu frais, puis lavées avec du PBS, et ensuite ré-incubées avec du milieu frais. Pour mesurer la charge bactérienne intracellulaire par puits, les surnageants ont été éliminés, puis les macrophages lysés par choc hypertonique (incubation des macrophages dans de l'eau milli-RO pendant 15 mins) et des étalements de différentes dilutions réalisés pour comptabiliser les CFUs. L'expérience présentée ci-dessus est représentative de deux répétitions biologiques. Les données à chaque temps d'infection représentent les moyennes des 3 réplicas par souche exprimées par rapport au temps 0 (CFU Tx / CFU T0). Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards à la moyenne; deux astérisques indiquent une P-value < 0,01, trois astérisques indiquent une P-value < 0,001. ns, non significatif.

surproduction de Rv0081 sur l'expression génique ont utilisé un système d'expression non autorégulable (Galagan et al., 2013). Ce schéma de régulation suggère également que l'activation de l'expression de *rv0081* par des signaux environnementaux, soit à travers le système DosR ou MprA, ou directement du fait de l'auto-répression, doit être transitoire. En revanche, cette activation peut être très efficace en terme de production de Rv0081. En effet, il a été démontré que la logique des schémas d'autorégulation négative est de permettre une réponse temporelle rapide (Rosenfeld et al., 2002). Le suivi de la cinétique d'expression de l'ensemble des gènes de *M.tb* pendant 14 jours lors d'une expérience d'infection de macrophages murins a effectivement mis en évidence cette activation transitoire de *rv0081* (Rohde et al., 2012). Un pic d'expression du gène est observé très précocement à deux heures d'infection, suivi d'une répression déjà observable à deux jours d'infection (le 2<sup>nd</sup> point de l'expérience) jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour, maintenant le niveau d'expression du gène sous le niveau pré-infection. Notre observation qu'une souche exprimant *rv0081* sous un promoteur artificiel (pGBT-*rv0081*) est tuée après sept jours d'infection suggère que la perte de cette capacité à autoréguler l'expression de *rv0081* ne permet pas de mettre en place et de maintenir une réponse adaptative à l'intérieur du macrophage. Cependant, l'observation que le mutant se multiplie plus efficacement que le *Wt* après sept jours d'infection indique que le niveau faible d'expression de *rv0081* dans le macrophage a également un impact sur le contrôle de la croissance de la bactérie dans le macrophage. De manière intéressante, le phénotype d'hypervirulence du mutant  $\Delta$ *rv0081* dans les macrophages a également été observée pour le mutant *mprA* (Pang et al., 2007; Zahrt and Deretic, 2001). Pour ce mutant, ce phénotype est directement corrélé à une atténuation chez la souris (Zahrt and Deretic, 2001). Ainsi, Rv0081 pourrait être également nécessaire pour la virulence chez l'animal. De plus, puisque *rv0081* appartient au régulon MprAB, il est possible que les phénotypes de virulence associés au mutant *mprA* dans les modèles infectieux soient au moins en partie dépendants de Rv0081. Ces données suggèrent donc que Rv0081 pourrait être un régulateur assurant un ajustement fin de la physiologie de *M.tb* *in vivo*. Rv0081 aurait un rôle transitoire favorisant le basculement vers un état physiologique favorisant la survie à l'intérieur du macrophage et un rôle plus permanent dans le contrôle de la vitesse de croissance. Sachant qu'il existe une relation entre la sensibilité aux composés toxiques et la vitesse de croissance, maintenir une croissance faible pourrait participer à l'état de dormance et par conséquent, à la tolérance de la bactérie aux différents composés toxiques lors du processus infectieux.





# **Discussion et perspectives**



Les AMs sont les constituants majeurs de la mycomembrane des mycobactéries. Du fait de leur importance pour la viabilité et la virulence, leur biosynthèse a été extrêmement étudiée par des approches biochimiques, en particulier par notre équipe. Cette thèse en privilégiant des approches de génétique moléculaire avait pour ambition d'une part, de valider les modèles biochimiques et d'autre part, d'apporter une vision dynamique et intégrée du rôle des AMs dans la physiologie, et la capacité adaptative des mycobactéries lors du processus infectieux. En partant de l'analyse de l'évolution, de l'expression et du rôle des gènes codant pour des sous-unités d'un complexe impliqué dans une étape spécifique de la biosynthèse des AMs, j'ai ensuite abordé la régulation de l'ensemble des gènes de biosynthèses et de transport des AMs pour enfin intégrer cette régulation à l'échelle de la cellule par l'analyse d'un régulateur global.

- **Rôle respectif des sous-unités des déshydratases HadAB et HadBC**

La biosynthèse des AMs matures nécessite une trentaine de gènes dont ceux codant pour les systèmes enzymatiques FAS-I, FAS-II et les MTs. L'équipe a identifié les gènes *hadA*, *hadB* et *hadC*, formant probablement un opéron, codant pour l'activité essentielle de déshydratation du complexe FAS-II. Elle a montré *in vitro*, que les sous-unités HadA, HadB et HadC formaient deux complexes tétramériques distincts, HadAB et HadBC et caractérisé leur activité (Sacco et al., 2007b). A la suite de ces travaux, le modèle d'activité suivant a été proposé: HadAB interviendrait au cours des étapes précoces d'élongation de la chaîne méromycolique alors que HadBC permettrait de terminer la synthèse pour générer les chaînes longues. A l'appui de ce modèle, les observations suivantes ont été réalisées: **(i)** l'absence d'un homologue à *hadC* chez certaine espèce bactérienne produisant des AMs de taille moyenne (*Rhodococcus* et *Nocardia*), et **(ii)** l'analogie avec le modèle d'activité des enzymes KasAB, avec KasA utilisant des substrats courts/moyens et KasB les plus longs. Cependant, la confirmation de ce modèle, datant de 2007, ainsi que la compréhension du rôle biologique des sous-unités HadA, HadB et HadC nécessitaient une approche génétique dans le but d'analyser les effets de l'inactivation des différents gènes.

Au début de ma thèse, l'utilisation et l'optimisation de la méthode de recombineering développée par van Kessel et collaborateurs (van Kessel and Hatfull, 2007; van Kessel et al., 2008) nous a rapidement permis de générer plusieurs mutants, dont les mutants  $\Delta hadC$  chez *M.smeg* et *M.tb*, et les mutants  $\Delta hadA$  et  $\Delta hadAC$  chez *M.smeg*. L'obtention de ces mutants permettait non seulement de confirmer le caractère non essentiel de *hadC* [ce qui était attendu,



**voir Introduction § IV, C, b), iii]**, mais révélait de manière surprenante que *hadA* était également dispensable et qu'en conséquence, seul *hadB* était nécessaire et suffisant pour la viabilité des mycobactéries. Ces résultats obligeaient clairement à nuancer le modèle de 2007 **[voir Introduction § IV, C, b), iii]**. On pourrait penser que HadBC qui est capable d'utiliser des substrats de grande taille, pourrait également utiliser les substrats de tailles plus petites. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'*in vitro* la spécificité des HadAB et HadBC pour leurs substrats en fonction de la taille n'est pas stricte (Sacco et al., 2007b). L'analyse des AMs du mutant  $\Delta hadA$  devrait nous donner des éléments de réponse. L'obtention du double mutant  $\Delta hadAC$  était encore plus surprenante. Cela suggérerait que HadB était suffisant pour maintenir une activité de déshydratation ou alternativement qu'il existe, dans la cellule, une activité pouvant compenser celle de HadA ou HadC. Nous favorisons cette dernière hypothèse sur la base de données à la fois de bio-informatique et expérimentales. En effet, nous avons identifié un paralogue à HadA et HadC, Rv0504c. Celui-ci possède un pourcentage d'identité important avec HadA et HadC (38,6% et 36,7%, respectivement), et le gène forme probablement un opéron avec *cmA2*, un gène codant pour une MT impliquée dans la décoration des AMs (**Figure 22**). Le gène *rv0504c* est ubiquitaire chez les mycobactéries et est prédit comme non essentiel pour la viabilité (Zhang et al., 2012). En accord avec cette prédiction, nous avons délété avec succès le gène *MSMEG\_0948*, l'orthologue de *rv0504c* chez *M.smeg*. Par contre, la délétion a été synthétique létale avec la double délétion de *hadA* et de *hadC*. Bien qu'encore préliminaires, ces résultats suggéraient donc que la viabilité du double mutant *hadAC* était due au fait que MSMEG\_0948 pouvait remplacer l'activité de HadA et de HadC et que HadB devait nécessairement fonctionner avec un partenaire. Il serait certainement intéressant de purifier cette protéine et de montrer qu'*in vitro* le complexe HadB/MSMEG\_0948 existe et qu'il possède une activité déshydratase. De même, il serait intéressant d'analyser *in vivo* les conséquences de l'inactivation de ce gène, ainsi que de son orthologue chez *M.tb*, sur la physiologie et la capacité adaptative des bactéries, notamment lors du processus infectieux dans le cas de *M.tb*. Ce travail sera réalisé au sein de l'équipe par **C. Lefebvre** (thèse 1<sup>ère</sup> année) sous la direction d'**A. Quémard**.

- **Le modèle d'activité proposé pour les déshydratases HadABC est-il correct ?**

L'obtention des différents mutants chez *M.tb* et *M.smeg* vont nous permettre de tester le modèle de 2007 issu des données de biochimie. A ce jour, seule l'analyse du mutant  $\Delta hadC$



de *M.tb* est complète [voir article p. 68]. Celle-ci a été réalisée au sein de l'équipe par N. Slama et F. Laval, N. Eynard et A. Quémard.

L'analyse a montré que la délétion de *hadC* n'a pas eu d'impact sur la taille des AMs majoritaires. Par conséquent, l'analogie avec le modèle d'activité du couple KasA/KasB n'est pas correcte. En effet, l'inactivation de *kasB* conduit à une diminution de la taille des AMs de 2 à 6C [voir Introduction § IV, C, b), ii]. Cependant, l'inactivation de *hadC* a eu pour conséquence la disparition d'une sous-catégorie très minoritaire d'AMs dits « extra-long » (XL-AMs), caractérisés par leur chaîne méromycolique plus longue de 9 à 13C. Ce résultat confirmait donc le modèle selon lequel HadC est impliquée dans les étapes terminales d'élongation des AMs, pour les espèces de type XL-AMs (voir figure 4 de l'article p. 68).

L'absence de HadC a eu également pour conséquence l'apparition d'une décoration supplémentaire sur les céto- et méthoxy-mycolates (cyclopropane ou double liaison), la disparition totale des espèces *trans*-cyclopropanées, mais aussi une variation importante de la distribution de chacune des sous-espèces d'AMs. Par conséquent, ces données montraient que HadC jouerait donc un rôle dans la mise en place des décorations sur les AMs « standards ». Une étude précédente menée par notre équipe avait montré que les deux hétérodimères HadAB et HadBC interagissaient directement avec la plupart des MTs [voir Introduction § IV, F (Cantaloube et al., 2011)], suggérant que l'activité de celles-ci pourrait être régulée par ces interactions. Nos données confirment effectivement qu'il puisse exister une interaction fonctionnelle entre HadC et l'activité des MTs, une notion également appuyée par la reconstruction de l'histoire évolutive du locus *hadABC* (voir ci-dessous et article p 71).

L'analyse phénotypique des mutants *had* a permis de mettre en évidence un rôle majeur de *hadC* dans la physiologie, la sensibilité à différents antibiotiques (dont certains utilisés dans la lutte contre la tuberculose), la capacité adaptative de *M.smeg*, et la virulence de *M.tb* sur un modèle murin (en collaboration avec l'équipe de R. Brosch, Institut Pasteur, Paris). Contrairement à *hadC*, l'inactivation de *hadA* n'avait pas d'impacts phénotypiques, probablement parce que HadC pouvait compenser l'absence de HadA [voir article p. 67]. Cependant l'inactivation de HadA dans un contexte  $\Delta$ *hadC*, pouvait exacerber le phénotype du simple mutant  $\Delta$ *hadC*, indiquant que HadA avait une activité propre, même si celle-ci semble secondaire à celle de HadC. L'ensemble de ces données a non seulement permis de mieux comprendre le rôle biologique des enzymes Had mais également, de renforcer leur intérêt comme cibles thérapeutiques potentielles. En effet, bien que les enzymes HadA et





HadC ne soient pas essentielles pour la viabilité des mycobactéries, nos études suggèrent que l'élaboration d'une stratégie thérapeutique ciblant HadA et HadC pourrait, en affaiblissant le fitness de *M.tb*, être bénéfique sur plusieurs aspects :

(i) Cela pourrait rendre *M.tb* plus sensible à différents antibiotiques déjà utilisés dans le traitement de la tuberculose, ce qui pourrait permettre de réduire la durée du traitement et/ou de diminuer les doses d'antibiotiques utilisés.

(ii) Cela pourrait sensibiliser la bactérie à des antibiotiques existants mais pour lesquels *M.tb* est naturellement résistant, ce qui augmenterait l'offre thérapeutique actuelle et permettre le traitement des tuberculoses actuellement résistantes.

(iii) Cela pourrait également rendre la bactérie plus sensible aux défenses naturelles de l'hôte, et donc permettre une élimination plus rapide de l'agent pathogène.

Sachant que la cause majeure de l'apparition des souches résistantes est due au fait que les traitements, à cause de leur pénibilité (plus de six mois de traitement et des effets secondaires) ne sont pas suivis rigoureusement, l'optimisation des traitements par ciblage des protéines Had, pourraient également diminuer l'apparition des résistances. Enfin, l'utilisation de mutants *had* qui sont plus sensibles aux antibiotiques pour le ciblage de chimiothèques, pourrait être une stratégie efficace pour trouver de nouveaux antituberculeux.

- **Régulation des gènes de biosynthèse des AMs par la réponse stringente**

Pour comprendre la contribution de la mycomembrane à la capacité adaptative des mycobactéries, notamment lors du processus infectieux, il est nécessaire de mieux comprendre la régulation des gènes de biosynthèse des AMs. L'organisation génétique du locus portant les gènes *hadABC* suggérait une co-régulation des gènes *hadABC* avec le potentiel de traduction. Effectivement, en identifiant cinq promoteurs permettant l'expression de *hadABC*, nous avons montré que les gènes *hadABC* pouvaient être co-transcrits avec trois gènes impliqués dans le processus de traduction : *metT*, *thrT* (codants pour des ARNt) et *rpmG2* (codant pour une protéine ribosomale). La multiplicité des promoteurs impliqués dans l'expression de l'opéron *hadABC* suggère également que l'opéron puisse être régulé par différents signaux au niveau transcriptionnel. A ceci s'ajoute l'identification récente d'un petit ARN antisens dans le locus *had* apportant un niveau de régulation supplémentaire à la régulation de *hadABC* (Miotto et al., 2012). En accord avec cette idée, nos données



préliminaires suggèrent en effet qu'il existe une régulation post-transcriptionnelle dans la région (données non montrées). La régulation de l'activité des protéines HadABC par phosphorylation a été rapportée (Slama et al., 2011). Chez *E. coli*, il existe des homologues fonctionnels de HadABC, FabA/Z dont l'activité a été montrée comme étant directement régulée par le ppGpp, le second messenger clef de la réponse stringente (RS) (Stein and Bloch, 1976). Il serait certainement intéressant de tester l'effet du ppGpp sur l'activité *in vitro* des déshydratases HadABC. La logique biologique de ces différents niveaux de régulation pourrait être de permettre d'une part, d'intégrer une multiplicité de signaux différents mais, d'autre part, d'assurer une réponse temporelle très efficace, de l'ordre de la milliseconde pour la régulation post-traductionnelle et de l'ordre du temps de génération, pour la régulation transcriptionnelle (Alon, 2007). L'ensemble de ces données suggère donc l'importance pour la bactérie de réguler l'expression et l'activité des gènes/protéines HadABC en fonction des différentes conditions environnementales. Chez des organismes modèles comme *E.coli* et *B.subtilis*, certains stress ou conditions de croissance (*e.g.* carence en acides aminés, carence en acides gras, phase stationnaire) conduisent à la répression des gènes codant les ARNt et les protéines ribosomales, et à l'induction d'autres gènes permettant l'adaptation cellulaire à ces conditions environnementales défavorables (Ryals et al, 1982; Jain et al, 2006). Plus précisément chez *E.coli*, la relation entre le potentiel traductionnel et le contrôle transcriptionnel direct du métabolisme des acides gras à travers la RS a été rapportée (My et al., 2013). Cette répression a un sens biologique, car la biosynthèse des acides gras représente un coût énergétique élevé pour la cellule, c'est pourquoi elle est constamment contrôlée pour maintenir un taux de croissance en adéquation avec les conditions environnementales (Zhang and Rock, 2009). Chez *M.tb*, mes travaux ont montré que cette relation entre potentiel de traduction et régulation transcriptionnelle des gènes de biosynthèse des AMs existait également, en accord avec une ancienne observation de l'équipe qu'en phase stationnaire, la biosynthèse des AMs est stoppée chez les mycobactéries (Lacave et al., 1989).

- **FAS-II un centre de contrôle pour la biosynthèse de l'ensemble des lipides de la bactérie ?**

De manière intéressante, seule une minorité de gènes régulés par la carence en nutriments l'est partiellement à travers la RS, essentiellement les gènes *hadABC* et *kasA* [appartenant à FAS-II, (**voir article p. 71**)], et aussi probablement *kasB* (Dahl et al 2003). Cela suggère que durant la RS, il y aurait un découplage entre l'activité de FAS-II avec les



autres partenaires de la voie de biosynthèse des AMs dont FAS-I. Dans un tel scénario, nous suggérons que la répression de l'expression de *hadABC* associée à l'activation de celles de *kasA* et *kasB* pourraient conduire à inverser le sens réactionnel de FAS-II vers FAS-I. Ceci aurait pour conséquence de détourner les produits intermédiaires résiduels issus de l'activité de FAS-II vers FAS-I pour la synthèse de lipides alternatifs en préparation à une entrée dans un état non réplcatif. Ce type de modification du flux métabolique pourrait contribuer au profond changement du métabolisme lipidique observé lors de stress conduisant à un état de dormance, dont notamment la répression de la synthèse de la plupart des lipides et la production de molécules de stockage d'énergie et de nutriments tel que le triacylglycérol (Galagan et al., 2013). L'importance de cette balance du flux de carbone entre des voies métaboliques lipidiques favorisant la croissance ou son arrêt pour le niveau de tolérance de *M.tb* aux antibiotiques a été démontrée (Baek et al., 2011). De même, un découplage entre FAS-I et FAS-II altérant le flux de carbone pour des synthèses alternatives a déjà été rapporté (Shi et al., 2010). Cependant, pour tester ce modèle il faudrait que nous puissions induire spécifiquement la RS chez *M.tb* pour d'une part, confirmer l'identité des gènes régulés dans ces conditions, et d'autre part, suivre de manière dynamique l'évolution du profil lipidique de la bactérie. Cette notion que FAS-II, par son impact sur les flux de carbone à l'intérieur de la cellule soit un centre de contrôle de la biosynthèse de l'ensemble des lipides, au-delà de celle des AMs, donne également un sens à la complexité mise en œuvre pour réguler l'opéron *hadABC*, une complexité qui permet de percevoir différents signaux environnementaux et de moduler l'activité de FAS-II en conséquence pour la biosynthèse d'espèces lipidiques appropriées.

- **Stabilité et modification des AMs**

Malgré la répression de l'expression de l'ensemble des gènes de biosynthèse et de transport des AMs lors d'une carence en nutriments, le profil global des AMs des souches *Wt* et *rel<sub>mtb</sub>* n'a pas été modifié, indiquant que les AMs sont des molécules stables (**voir article p. 71**). Cependant, l'expression de 2 des 6 gènes codant pour des MTs (*pcaA* et *cmaA2*) activée pendant la carence suggère que le profil des décorations de la chaîne méromycolique soit modifié. Il est probable que seuls les AMs issus de l'activité résiduelle de synthèse soient concernés et donc ne représenteraient qu'une petite fraction des AMs. Par conséquent, pour révéler cette population, il serait certainement nécessaire de suivre de manière dynamique la



biosynthèse *de novo* (suivie par marquage radioactif). Par ailleurs, seules des expériences de « pulse-chase » permettraient d'apporter des données chiffrées sur la stabilité des AMs.

- **Les contraintes fonctionnelles qui ont dessiné l'organisation génétique du locus *hadABC-mmaA1-4*.**

L'opéron *hadABC* est localisé au milieu de gènes impliqués dans le processus de traduction mais également chez *M.tb* à proximité des gènes *mmaA1-4* codant pour des MTs impliquées dans la modification chimique de la chaîne méromycolique [voir Introduction § IV, C, c)]. Une analyse phylogénétique au sein des actinobactéries réalisée en collaboration avec Y. Quentin et G. Fichant (LMGM, Toulouse) a permis de retracer le scénario évolutif qui a conduit à l'organisation génétique actuelle de ce locus chez *M.tb*. Bien que la grande plasticité observée au sein des actinobactéries indique que cette région du chromosome est un « hot-spot » de recombinaison, nous proposons que la conservation de l'organisation génétique actuelle de ce locus chez *M.tb* résulte de l'avantage sélectif que celle-ci procure à la bactérie. Elle a permis d'une part, une co-régulation de l'opéron *hadABC* avec les gènes du processus de traduction et d'autre part, de favoriser les interactions physiques et fonctionnelles entre les protéines Had et les MTs. Cette dernière proposition appuie le modèle selon lequel l'addition des groupements fonctionnels sur la chaîne méromycolique serait faite de manière concomitante avec la biosynthèse de celle-ci par le complexe FAS-II. Il est à noter que le paralogue de *hadA* et *hadC*, *rv0504c* est également localisé en amont de *cmaA2*, un gène codant pour une MT, renforçant l'idée d'une relation fonctionnelle étroite entre l'activité déshydratase et l'activité des MTs. Pour notre étude, cette approche bio-informatique a été très informative. Il serait sans aucun doute intéressant d'étendre cette analyse aux autres gènes de biosynthèse des AMs déjà connus, mais aussi aux gènes candidats potentiels pour d'une part, avoir une vision évolutive plus globale, et d'autre part, rationaliser le choix de l'étude de gènes candidats.

- **Le contrôle temporel du régulateur Rv0081 essentiel à l'adaptation intramacrophagique ?**

En accord avec la prédiction du rôle central du facteur transcriptionnel Rv0081 pour la capacité adaptative de *M.tb*, nous avons montré que l'inactivation de Rv0081 et/ou une expression non adéquate du gène affectaient la croissance de la bactérie à l'intérieur des macrophages. Nous proposons que Rv0081 intervienne à 2 niveaux lors du processus





infectieux, précocement et ponctuellement pour déclencher un programme génétique permettant la mise en place d'une réponse adaptative et ensuite, de manière prolongée, pour la maîtrise du taux de multiplication de la bactérie au sein du macrophage. Dans le 1<sup>er</sup> cas, c'est l'activation transitoire de l'expression du gène qui est nécessaire alors que dans le 2<sup>nd</sup> cas, c'est le maintien d'un niveau d'expression faible qui est important. En effet, lorsque l'expression de *rv0081* n'est plus temporellement contrôlée, la viabilité des bactéries est compromise et en l'absence totale de Rv0081, le taux de croissance au lieu de rester constant reprend après 7 jours d'infection. Cette incapacité à contrôler la croissance pourrait avoir comme conséquence la diminution de la virulence, ainsi observée pour le mutant *mprA* (Zahrt and Deretic, 2001). Sachant qu'il existe une corrélation inverse entre la croissance et la tolérance aux composés toxiques, Rv0081, en contribuant au maintien d'une croissance faible, pourrait permettre une meilleure résistance des bactéries aux défenses de l'hôte. L'implication de Rv0081 dans le contrôle de la croissance est en accord avec les prédictions des approches systémiques que Rv0081 est un régulateur global et central (Galagan et al., 2013). Pour conforter le rôle de Rv0081, notamment dans le contrôle du métabolisme lipidique, il sera nécessaire de mesurer et comparer les cinétiques d'expression des gènes et de biosynthèse des lipides entre les souches ayant conservé une régulation normale ou altérée de l'expression de *rv0081*.



# Bibliographie

- Abel, L., El-Baghdadi, J., Bousfiha, A.A., Casanova, J.-L., and Schurr, E. (2014). Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369, 20130428.
- Alderwick, L.J., Radmacher, E., Seidel, M., Gande, R., Hitchen, P.G., Morris, H.R., Dell, A., Sahm, H., Eggeling, L., and Besra, G.S. (2005). Deletion of Cg-emb in corynebacterianae leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of Cg-ubiA results in an arabinan-deficient mutant with a cell wall galactan core. *J. Biol. Chem.* 280, 32362–32371.
- Aldridge, B.B., Fernandez-Suarez, M., Heller, D., Ambravaneswaran, V., Irimia, D., Toner, M., and Fortune, S.M. (2012). Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility. *Science* 335, 100–104.
- Alibaud, L., Alahari, A., Trivelli, X., Ojha, A.K., Hatfull, G.F., Guerardel, Y., and Kremer, L. (2010). Temperature-dependent regulation of mycolic acid cyclopropanation in saprophytic mycobacteria: role of the *Mycobacterium smegmatis* 1351 gene (MSMEG\_1351) in CIS-cyclopropanation of alpha-mycolates. *J. Biol. Chem.* 285, 21698–21707.
- Alon, U. (2007). An introduction to systems biology: design principles of biological circuits (CRC press).
- Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Göhlmann, H.W.H., Neefs, J.-M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., et al. (2005). A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 307, 223–227.
- Arbues, A., Aguilo, J.I., Gonzalo-Asensio, J., Marinova, D., Uranga, S., Puentes, E., Fernandez, C., Parra, A., Cardona, P.J., Vilaplana, C., et al. (2013). Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine* 31, 4867–4873.
- Asante-Poku, A., Yeboah-Manu, D., Otchere, I.D., Aboagye, S.Y., Stucki, D., Hattendorf, J., Borrell, S., Feldmann, J., Danso, E., and Gagneux, S. (2015). *Mycobacterium africanum* Is Associated with Patient Ethnicity in Ghana. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e3370.
- Ashford, D.A., Whitney, E., Raghunathan, P., and Cosivi, O. (2001). Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 20, 325–337.
- Asselineau, J., and Lederer, E. (1950). Structure of the mycolic acids of *Mycobacteria*. *Nature* 166, 782–783.
- Astarie-Dequeker, C., Le Guyader, L., Malaga, W., Seaphanh, F.-K., Chalut, C., Lopez, A., and Guilhot, C. (2009). Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog.* 5, e1000289.
- Avarbock, A., Avarbock, D., Teh, J.-S., Buckstein, M., Wang, Z., and Rubin, H. (2005). Functional regulation of the opposing (p)ppGpp synthetase/hydrolase activities of RelMtb from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 9913–9923.
- Avarbock, D., Avarbock, A., and Rubin, H. (2000). Differential regulation of opposing RelMtb activities by the aminoacylation state of a tRNA.ribosome.mRNA.RelMtb complex. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 11640–11648.
- Baba, T., Kaneda, K., Kusunose, E., Kusunose, M., and Yano, I. (1989). Thermally adaptive changes of mycolic acids in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biochem. (Tokyo)* 106, 81–86.
- Baek, S.-H., Li, A.H., and Sasseti, C.M. (2011). Metabolic regulation of mycobacterial growth and antibiotic sensitivity. *PLoS Biol.* 9, e1001065.
- Bakal, C.J., and Davies, J.E. (2000). No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria. *Trends Cell Biol.* 10, 32–38.
- Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305, 1622–1625.
- Balaban, N.Q., Gerdes, K., Lewis, K., and McKinney, J.D. (2013). A problem of persistence: still more questions than answers? *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 587–591.
- Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K.S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G., and Jacobs, W.R. (1994). *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 263, 227–230.
- Banerjee, A., Sugantino, M., Sacchettini, J.C., and Jacobs, W.R. (1998). The *mabA* gene from the *inhA* operon of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3-ketoacyl reductase that fails to confer isoniazid resistance. *Microbiol. Read. Engl.* 144 (Pt 10), 2697–2704.
- Barkan, D., Rao, V., Sukenick, G.D., and Glickman, M.S. (2010). Redundant function of *cmaA2* and *mmaA2* in *Mycobacterium tuberculosis* cis cyclopropanation of oxygenated mycolates. *J. Bacteriol.* 192, 3661–3668.



- Barkan, D., Hedhli, D., Yan, H.-G., Huygen, K., and Glickman, M.S. (2012). *Mycobacterium tuberculosis* lacking all mycolic acid cyclopropanation is viable but highly attenuated and hyperinflammatory in mice. *Infect. Immun.* *80*, 1958–1968.
- Barry, C.E., Lee, R.E., Mdluli, K., Sampson, A.E., Schroeder, B.G., Slayden, R.A., and Yuan, Y. (1998). Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* *37*, 143–179.
- Bartek, I.L., Woolhiser, L.K., Baughn, A.D., Basaraba, R.J., Jacobs, W.R., Lenaerts, A.J., and Voskuil, M.I. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* Lsr2 is a global transcriptional regulator required for adaptation to changing oxygen levels and virulence. *mBio* *5*, e01106–e01114.
- Becich, M.J., Carroll, S., and Ratliff, T.L. (1991). Internalization of bacille Calmette-Guerin by bladder tumor cells. *J. Urol.* *145*, 1316–1324.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., and Freeman, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 1620–1624.
- Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* *87*, 245–313.
- Behr, M.A., Schroeder, B.G., Brinkman, J.N., Slayden, R.A., and Barry, C.E. (2000). A point mutation in the *mma3* gene is responsible for impaired methoxymycolic acid production in *Mycobacterium bovis* BCG strains obtained after 1927. *J. Bacteriol.* *182*, 3394–3399.
- Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J., and Besra, G.S. (1997). Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* *276*, 1420–1422.
- Beney, L., and Gervais, P. (2001). Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *57*, 34–42.
- Bhamidi, S., Scherman, M.S., Rithner, C.D., Prenni, J.E., Chatterjee, D., Khoo, K.-H., and McNeil, M.R. (2008). The identification and location of succinyl residues and the characterization of the interior arabinan region allow for a model of the complete primary structure of *Mycobacterium tuberculosis* mycolyl arabinogalactan. *J. Biol. Chem.* *283*, 12992–13000.
- Bhatt, A., Kremer, L., Dai, A.Z., Sacchettini, J.C., and Jacobs, W.R. (2005). Conditional depletion of *KasA*, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to mycobacterial cell lysis. *J. Bacteriol.* *187*, 7596–7606.
- Bhatt, A., Fujiwara, N., Bhatt, K., Gurucha, S.S., Kremer, L., Chen, B., Chan, J., Porcelli, S.A., Kobayashi, K., Besra, G.S., et al. (2007a). Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 5157–5162.
- Bhatt, A., Molle, V., Besra, G.S., Jacobs, W.R., and Kremer, L. (2007b). The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Mol. Microbiol.* *64*, 1442–1454.
- Biswas, R.K., Dutta, D., Tripathi, A., Feng, Y., Banerjee, M., and Singh, B.N. (2013). Identification and characterization of Rv0494: a fatty acid-responsive protein of the GntR/FadR family from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Read. Engl.* *159*, 913–923.
- Bloch, H. (1950). Studies on the virulence of tubercle bacilli; isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. *J. Exp. Med.* *91*, 197–218, pl.
- Bloch, K., and Vance, D. (1977). Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids. *Annu. Rev. Biochem.* *46*, 263–298.
- Boehme, C.C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M.P., Shenai, S., Krapp, F., Allen, J., Tahirli, R., Blakemore, R., Rustonjee, R., et al. (2010). Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.* *363*, 1005–1015.
- Boldrin, F., Casonato, S., Dainese, E., Sala, C., Dhar, N., Palù, G., Riccardi, G., Cole, S.T., and Manganelli, R. (2010). Development of a repressible mycobacterial promoter system based on two transcriptional repressors. *Nucleic Acids Res.* *38*, e134.
- Boon, C., and Dick, T. (2002). *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. *J. Bacteriol.* *184*, 6760–6767.
- Borgaro, J.G., Chang, A., Machutta, C.A., Zhang, X., and Tonge, P.J. (2011). Substrate recognition by  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthases. *Biochemistry (Mosc.)* *50*, 10678–10686.
- Botella, H., Peyron, P., Levillain, F., Poincloux, R., Poquet, Y., Brandli, I., Wang, C., Tailleux, L., Tilleul, S., Charrière, G.M., et al. (2011). *Mycobacterial* p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe* *10*, 248–259.
- Boutte, C.C., and Crosson, S. (2013). Bacterial lifestyle shapes stringent response activation. *Trends Microbiol.* *21*, 174–180.
- Brandt, L., Feino Cunha, J., Weinreich Olsen, A., Chilima, B., Hirsch, P., Appelberg, R., and Andersen, P. (2002). Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect. Immun.* *70*, 672–678.



- Bretl, D.J., Demetriadou, C., and Zahrt, T.C. (2011). Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR* *75*, 566–582.
- Brown, A.K., Bhatt, A., Singh, A., Saparia, E., Evans, A.F., and Besra, G.S. (2007). Identification of the dehydratase component of the mycobacterial mycolic acid-synthesizing fatty acid synthase-II complex. *Microbiol. Read. Engl.* *153*, 4166–4173.
- Bruns, H., and Stenger, S. (2014). New insights into the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and human macrophages. *Future Microbiol.* *9*, 327–341.
- Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* *407*, 211–215.
- Butler, S.M., Festa, R.A., Pearce, M.J., and Darwin, K.H. (2006). Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* *60*, 553–562.
- Camacho, L.R., Constant, P., Raynaud, C., Laneelle, M.A., Triccas, J.A., Gicquel, B., Daffé, M., and Guilhot, C. (2001). Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J. Biol. Chem.* *276*, 19845–19854.
- Campbell, D.R., Chapman, K.E., Waldron, K.J., Tottey, S., Kendall, S., Cavallaro, G., Andreini, C., Hinds, J., Stoker, N.G., Robinson, N.J., et al. (2007). Mycobacterial cells have dual nickel-cobalt sensors: sequence relationships and metal sites of metal-responsive repressors are not congruent. *J. Biol. Chem.* *282*, 32298–32310.
- Cantaloube, S., Veyron-Churlet, R., Haddache, N., Daffé, M., and Zerbib, D. (2011). The *Mycobacterium Tuberculosis* FAS-II Dehydratases and Methyltransferases Define the Specificity of the Mycolic Acid Elongation Complexes. *PLoS ONE* *6*.
- Cardona, P.-J. (2006). RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberc. Edinb. Scotl.* *86*, 273–289.
- Carel, C., Nukdee, K., Cantaloube, S., Bonne, M., Diagne, C.T., Laval, F., Daffé, M., and Zerbib, D. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* proteins involved in mycolic acid synthesis and transport localize dynamically to the old growing pole and septum. *PLoS One* *9*, e97148.
- Cashel, M., and Gallant, J. (1969). Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* *221*, 838–841.
- Chalut, C., Botella, L., de Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., and Guilhot, C. (2006). The nonredundant roles of two 4'-phosphopantetheinyl transferases in vital processes of *Mycobacteria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 8511–8516.
- Champion, P.A.D., Champion, M.M., Manzanillo, P., and Cox, J.S. (2009). ESX-1 secreted virulence factors are recognized by multiple cytosolic AAA ATPases in pathogenic mycobacteria. *Mol. Microbiol.* *73*, 950–962.
- Chan, E.D., Kinney, W.H., Honda, J.R., Bishwakarma, R., Gangavelli, A., Mya, J., Bai, X., and Ordway, D.J. (2014). Tobacco exposure and susceptibility to tuberculosis: is there a smoking gun? *Tuberc. Edinb. Scotl.* *94*, 544–550.
- Chao, M.C., and Rubin, E.J. (2010). Letting sleeping dogs lie: does dormancy play a role in tuberculosis? *Annu. Rev. Microbiol.* *64*, 293–311.
- Cho, H.Y., Cho, H.J., Kim, Y.M., Oh, J.I., and Kang, B.S. (2009). Structural insight into the heme-based redox sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* *284*, 13057–13067.
- Choi, K.H., Kremer, L., Besra, G.S., and Rock, C.O. (2000). Identification and substrate specificity of beta -ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* *275*, 28201–28207.
- Cohen, K., and Meintjes, G. (2010). Management of individuals requiring antiretroviral therapy and TB treatment. *Curr. Opin. HIV AIDS* *5*, 61–69.
- Cohen-Gonsaud, M., Ducasse, S., Hoh, F., Zerbib, D., Labesse, G., and Quemard, A. (2002). Crystal structure of MabA from *Mycobacterium tuberculosis*, a reductase involved in long-chain fatty acid biosynthesis. *J. Mol. Biol.* *320*, 249–261.
- Colangeli, R., Haq, A., Arcus, V.L., Summers, E., Magliozzo, R.S., McBride, A., Mitra, A.K., Radjainia, M., Khajo, A., Jacobs, W.R., et al. (2009). The multifunctional histone-like protein Lsr2 protects mycobacteria against reactive oxygen intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4414–4418.
- Colditz, G.A., Brewer, T.F., Berkey, C.S., Wilson, M.E., Burdick, E., Fineberg, H.V., and Mosteller, F. (1994). Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* *271*, 698–702.
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honoré, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., et al. (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* *409*, 1007–1011.
- Collins, M.D., Burton, R.A., and Jones, D. (1988). *Corynebacterium amycolatum* sp. nov. a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS Microbiol. Lett.* *49*, 349–352.





- Collins, M.D., Falsen, E., Akervall, E., Sjöden, B., and Alvarez, A. (1998). *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. nov., a novel corynebacterium that does not contain mycolic acids. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 4, 1449–1454.
- Converse, P.J., Karakousis, P.C., Klinkenberg, L.G., Kesavan, A.K., Ly, L.H., Allen, S.S., Grosset, J.H., Jain, S.K., Lamichhane, G., Manabe, Y.C., et al. (2009). Role of the dosR-dosS two-component regulatory system in *Mycobacterium tuberculosis* virulence in three animal models. *Infect. Immun.* 77, 1230–1237.
- Corrales, R.M., Molle, V., Leiba, J., Mourey, L., de Chastellier, C., and Kremer, L. (2012). Phosphorylation of mycobacterial PcaA inhibits mycolic acid cyclopropanation: consequences for intracellular survival and for phagosome maturation block. *J. Biol. Chem.* 287, 26187–26199.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de Kantor, I., and Meslin, F.X. (1998). Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 59–70.
- Crick, D.C., Mahapatra, S., and Brennan, P.J. (2001). Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* 11, 107R – 118R.
- Cronan, J.E. (2002). Phospholipid modifications in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 202–205.
- Daffé, M. (2015). The cell envelope of tubercle bacilli. *Tuberc. Edinb. Scotl.*
- Daffé, M., and Laneelle, M.A. (1988). Distribution of phthiocerol diester, phenolic mycosides and related compounds in mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2049–2055.
- Dahl, J.L., Kraus, C.N., Boshoff, H.I.M., Doan, B., Foley, K., Avarbock, D., Kaplan, G., Mizrahi, V., Rubin, H., and Barry, C.E. (2003). The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10026–10031.
- Dahl, J.L., Arora, K., Boshoff, H.I., Whiteford, D.C., Pacheco, S.A., Walsh, O.J., Lau-Bonilla, D., Davis, W.B., and Garza, A.G. (2005). The relA homolog of *Mycobacterium smegmatis* affects cell appearance, viability, and gene expression. *J. Bacteriol.* 187, 2439–2447.
- Dalebroux, Z.D., Svensson, S.L., Gaynor, E.C., and Swanson, M.S. (2010). ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 74, 171–199.
- Dalmia, N., and Ramsay, A.J. (2012). Prime-boost approaches to tuberculosis vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 11, 1221–1233.
- Daniel, J., Deb, C., Dubey, V.S., Sirakova, T.D., Abomoelak, B., Morbidoni, H.R., and Kolattukudy, P.E. (2004). Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. *J. Bacteriol.* 186, 5017–5030.
- Daniel, J., Oh, T.-J., Lee, C.-M., and Kolattukudy, P.E. (2007). AccD6, a member of the Fas II locus, is a functional carboxyltransferase subunit of the acyl-coenzyme A carboxylase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 189, 911–917.
- Darwin, K.H., and Nathan, C.F. (2005). Role for nucleotide excision repair in virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 73, 4581–4587.
- Darwin, K.H., Ehrt, S., Gutierrez-Ramos, J.-C., Weich, N., and Nathan, C.F. (2003). The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. *Science* 302, 1963–1966.
- Davidson, L.A., Draper, P., and Minnikin, D.E. (1982). Studies on the mycolic acids from the walls of *Mycobacterium microti*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 823–828.
- Deraeve, C., Dorobantu, I.M., Rebbah, F., Le Quémener, F., Constant, P., Quémard, A., Bernardes-Génisson, V., Bernadou, J., and Pratviel, G. (2011). Chemical synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship analysis of azaisoindolinones, a novel class of direct enoyl-ACP reductase inhibitors as potential antimycobacterial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 6225–6232.
- Dkhar, H.K., Nanduri, R., Mahajan, S., Dave, S., Saini, A., Somavarapu, A.K., Arora, A., Parkesh, R., Thakur, K.G., Mayilraj, S., et al. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* keto-mycolic acid and macrophage nuclear receptor TR4 modulate foamy biogenesis in granulomas: a case of a heterologous and noncanonical ligand-receptor pair. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 295–305.
- Domenech, P., Reed, M.B., and Barry, C.E. (2005). Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect. Immun.* 73, 3492–3501.
- Dooley, K.E., and Chaisson, R.E. (2009). Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. *Lancet Infect. Dis.* 9, 737–746.
- Drumm, J.E., Mi, K., Bilder, P., Sun, M., Lim, J., Bielefeldt-Ohmann, H., Basaraba, R., So, M., Zhu, G., Tufariello, J.M., et al. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein Rv2623 regulates bacillary growth by ATP-Binding: requirement for establishing chronic persistent infection. *PLoS Pathog.* 5, e1000460.



- Dubnau, E., Marrakchi, H., Smith, I., Daff , M., and Quémard, A. (1998). Mutations in the *cmaB* gene are responsible for the absence of methoxymycolic acid in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. *Mol. Microbiol.* *29*, 1526–1528.
- Dubnau, E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V.P., Lanéelle, M.A., Yu, K., Quémard, A., Smith, I., and Daff , M. (2000). Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.* *36*, 630–637.
- Edwards, K.M., Cynamon, M.H., Voladri, R.K., Hager, C.C., DeStefano, M.S., Tham, K.T., Lakey, D.L., Bochan, M.R., and Kernodle, D.S. (2001). Iron-cofactored superoxide dismutase inhibits host responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *164*, 2213–2219.
- Ehrt, S., and Schnappinger, D. (2009). Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell. Microbiol.* *11*, 1170–1178.
- Elias, D., Akuffo, H., Pawlowski, A., Haile, M., Schön, T., and Britton, S. (2005). *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* *23*, 1326–1334.
- Farhat, M., Greenaway, C., Pai, M., and Menzies, D. (2006). False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* *10*, 1192–1204.
- Farinacci, M., Weber, S., and Kaufmann, S.H.E. (2012). The recombinant tuberculosis vaccine rBCG  $\Delta$ ureC::hly(+) induces apoptotic vesicles for improved priming of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Vaccine* *30*, 7608–7614.
- Fernandes, N.D., and Kolattukudy, P.E. (1996). Cloning, sequencing and characterization of a fatty acid synthase-encoding gene from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *Gene* *170*, 95–99.
- Ferrell, J.E. (2002). Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 140–148.
- Fine, P.E. (1995). Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* *346*, 1339–1345.
- Fort  n, J., Martín-D  vila, P., Navas, E., Pérez-El  as, M.J., Cobo, J., Tato, M., De la Pedrosa, E.G.-G., Gómez-Mampaso, E., and Moreno, S. (2005). Linezolid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* *56*, 180–185.
- Fortune, S.M., and Rubin, E.J. (2007). The complex relationship between mycobacteria and macrophages: it’s not all bliss. *Cell Host Microbe* *2*, 5–6.
- Fratti, R.A., Backer, J.M., Gruenberg, J., Corvera, S., and Deretic, V. (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J. Cell Biol.* *154*, 631–644.
- Fu, L.M., and Fu-Liu, C.S. (2007). The gene expression data of *Mycobacterium tuberculosis* based on Affymetrix gene chips provide insight into regulatory and hypothetical genes. *BMC Microbiol.* *7*, 37.
- Fu, X., and Chang, Z. (2004). Temperature-dependent subunit exchange and chaperone-like activities of Hsp16.3, a small heat shock protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *316*, 291–299.
- Galagan, J.E., Minch, K., Peterson, M., Lyubetskaya, A., Azizi, E., Sweet, L., Gomes, A., Rustad, T., Dolganov, G., Glotova, I., et al. (2013). The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia. *Nature* *499*, 178–183.
- Gandhi, N.M., Morales, A., and Lamm, D.L. (2013). *Bacillus Calmette-Guérin* immunotherapy for genitourinary cancer. *BJU Int.* *112*, 288–297.
- Gandotra, S., Schnappinger, D., Monteleone, M., Hillen, W., and Ehrt, S. (2007). In vivo gene silencing identifies the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome as essential for the bacteria to persist in mice. *Nat. Med.* *13*, 1515–1520.
- Gao, L.-Y., Laval, F., Lawson, E.H., Groger, R.K., Woodruff, A., Morisaki, J.H., Cox, J.S., Daff , M., and Brown, E.J. (2003). Requirement for *kasB* in *Mycobacterium mycolic acid* biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol. Microbiol.* *49*, 1547–1563.
- Gao, L.-Y., Guo, S., McLaughlin, B., Morisaki, H., Engel, J.N., and Brown, E.J. (2004). A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol. Microbiol.* *53*, 1677–1693.
- Garner, A.L., Weiss, L.A., Manzano, A.R., Galburt, E.A., and Stallings, C.L. (2014). *CarD* integrates three functional modules to promote efficient transcription, antibiotic tolerance, and pathogenesis in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* *93*, 682–697.
- Gavald , S., Léger, M., van der Rest, B., Stella, A., Bardou, F., Montrozier, H., Chalut, C., Burlet-Schiltz, O., Marrakchi, H., Daff , M., et al. (2009). The Pks13/FadD32 crosstalk for the biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* *284*, 19255–19264.
- Gavald , S., Bardou, F., Laval, F., Bon, C., Malaga, W., Chalut, C., Guilhot, C., Mourey, L., Daff , M., and Quémard, A. (2014). The polyketide synthase Pks13 catalyzes a novel mechanism of lipid transfer in mycobacteria. *Chem. Biol.* *21*, 1660–1669.



- Av-Gay, Y., and Everett, M. (2000). The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* *8*, 238–244.
- Gengenbacher, M., and Kaufmann, S.H.E. (2012). *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol. Rev.* *36*, 514–532.
- Gengenbacher, M., Rao, S.P.S., Pethe, K., and Dick, T. (2010). Nutrient-starved, non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability. *Microbiol. Read. Engl.* *156*, 81–87.
- Ghosh, S., Sureka, K., Ghosh, B., Bose, I., Basu, J., and Kundu, M. (2011). Phenotypic heterogeneity in mycobacterial stringent response. *BMC Syst. Biol.* *5*, 18.
- Giffin, M.M., Raab, R.W., Morganstern, M., and Sohaskey, C.D. (2012). Mutational analysis of the respiratory nitrate transporter NarK2 of *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS One* *7*, e45459.
- Glickman, M.S. (2003). The *mmaA2* gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes the distal cyclopropane synthase of the alpha-mycolic acid. *J. Biol. Chem.* *278*, 7844–7849.
- Glickman, M.S., Cox, J.S., and Jacobs, W.R., Jr (2000). A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell* *5*, 717–727.
- Glickman, M.S., Cahill, S.M., and Jacobs, W.R. (2001). The *Mycobacterium tuberculosis* *cmaA2* gene encodes a mycolic acid trans-cyclopropane synthetase. *J. Biol. Chem.* *276*, 2228–2233.
- Gomez, J.E., and McKinney, J.D. (2004). *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberc. Edinb. Scotl.* *84*, 29–44.
- Goude, R., and Parish, T. (2008). The genetics of cell wall biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol.* *3*, 299–313.
- Gouzy, A., Larrouy-Maumus, G., Wu, T.-D., Peixoto, A., Levillain, F., Lugo-Villarino, G., Guerquin-Kern, J.-L., Gerquin-Kern, J.-L., de Carvalho, L.P.S., Poquet, Y., et al. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen assimilation and host colonization require aspartate. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 674–676.
- Gouzy, A., Larrouy-Maumus, G., Bottai, D., Levillain, F., Dumas, A., Wallach, J.B., Caire-Brandli, I., de Chastellier, C., Wu, T.-D., Poincloux, R., et al. (2014a). *Mycobacterium tuberculosis* exploits asparagine to assimilate nitrogen and resist acid stress during infection. *PLoS Pathog.* *10*, e1003928.
- Gouzy, A., Poquet, Y., and Neyrolles, O. (2014b). Amino acid capture and utilization within the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Future Microbiol.* *9*, 631–637.
- Gouzy, A., Poquet, Y., and Neyrolles, O. (2014c). Nitrogen metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and virulence. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 729–737.
- Griffin, J.E., Gawronski, J.D., Dejesus, M.A., Ioerger, T.R., Akerley, B.J., and Sassetti, C.M. (2011). High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog.* *7*, e1002251.
- Grode, L., Seiler, P., Baumann, S., Hess, J., Brinkmann, V., Nasser Eddine, A., Mann, P., Goosmann, C., Bandermann, S., Smith, D., et al. (2005). Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J. Clin. Invest.* *115*, 2472–2479.
- Gröschel, M.I., Prabowo, S.A., Cardona, P.-J., Stanford, J.L., and Werf, T.S. van der (2014). Therapeutic vaccines for tuberculosis—A systematic review. *Vaccine* *32*, 3162–3168.
- Grzegorzewicz, A.E., Pham, H., Gundi, V.A.K.B., Scherman, M.S., North, E.J., Hess, T., Jones, V., Gruppo, V., Born, S.E.M., Korduláková, J., et al. (2012). Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 334–341.
- Guirado, E., Gil, O., Cáceres, N., Singh, M., Vilaplana, C., and Cardona, P.-J. (2008). Induction of a specific strong polyantigenic cellular immune response after short-term chemotherapy controls bacillary reactivation in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* *15*, 1229–1237.
- Gulten, G., and Sacchettini, J.C. (2013). Structure of the Mtb CarD/RNAP  $\beta$ -lobes complex reveals the molecular basis of interaction and presents a distinct DNA-binding domain for Mtb CarD. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *21*, 1859–1869.
- Gupta, A., Kaul, A., Tsolaki, A.G., Kishore, U., and Bhakta, S. (2012). *Mycobacterium tuberculosis*: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology* *217*, 363–374.
- Gutierrez, M.C., Supply, P., and Brosch, R. (2009). Pathogenomics of mycobacteria. *Genome Dyn.* *6*, 198–210.



- Haagsma, A.C., Abdillahi-Ibrahim, R., Wagner, M.J., Krab, K., Vergauwen, K., Guillemont, J., Andries, K., Lill, H., Koul, A., and Bald, D. (2009). Selectivity of TMC207 towards mycobacterial ATP synthase compared with that towards the eukaryotic homologue. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 1290–1292.
- Hampshire, T., Soneji, S., Bacon, J., James, B.W., Hinds, J., Laing, K., Stabler, R.A., Marsh, P.D., and Butcher, P.D. (2004). Stationary phase gene expression of *Mycobacterium tuberculosis* following a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms? *Tuberc. Edinb. Scotl.* *84*, 228–238.
- Harrieff, M.J., Purdy, G.E., and Lewinsohn, D.M. (2012). Escape from the Phagosome: The Explanation for MHC-I Processing of Mycobacterial Antigens? *Front. Immunol.* *3*, 40.
- Harth, G., Maslesa-Galić, S., and Horwitz, M.A. (2004). A two-plasmid system for stable, selective-pressure-independent expression of multiple extracellular proteins in mycobacteria. *Microbiol. Read. Engl.* *150*, 2143–2151.
- Haseltine, W.A., and Block, R. (1973). Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *70*, 1564–1568.
- Haugen, S.P., Ross, W., and Gourse, R.L. (2008). Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 507–519.
- Hauryliuk, V., Atkinson, G.C., Murakami, K.S., Tenson, T., and Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.*
- He, H., Hovey, R., Kane, J., Singh, V., and Zahrt, T.C. (2006). MprAB is a stress-responsive two-component system that directly regulates expression of sigma factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* *188*, 2134–2143.
- He, H., Bretl, D.J., Penoske, R.M., Anderson, D.M., and Zahrt, T.C. (2011). Components of the Rv0081-Rv0088 locus, which encodes a predicted formate hydrogenlyase complex, are coregulated by Rv0081, MprA, and DosR in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* *193*, 5105–5118.
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J.M., and Engelhardt, H. (2008). Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3963–3967.
- Honaker, R.W., Leistikow, R.L., Bartek, I.L., and Voskuil, M.I. (2009). Unique roles of DosT and DosS in DosR regulon induction and *Mycobacterium tuberculosis* dormancy. *Infect. Immun.* *77*, 3258–3263.
- Houben, D., Demangel, C., van Ingen, J., Perez, J., Baldeón, L., Abdallah, A.M., Caleechurn, L., Bottai, D., van Zon, M., de Punder, K., et al. (2012). ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell. Microbiol.* *14*, 1287–1298.
- Hu, Y., Movahedzadeh, F., Stoker, N.G., and Coates, A.R.M. (2006). Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis*  $\alpha$ -Crystallin-Like hspX Gene Causes Increased Bacterial Growth In Vivo. *Infect. Immun.* *74*, 861–868.
- Indrigo, J., Hunter, R.L., and Actor, J.K. (2002). Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. *Microbiol. Read. Engl.* *148*, 1991–1998.
- Indrigo, J., Hunter, R.L., and Actor, J.K. (2003). Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiol. Read. Engl.* *149*, 2049–2059.
- Infante, E., Aguilar, L.D., Gicquel, B., and Pando, R.H. (2005). Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium tuberculosis* fadD26 mutant. *Clin. Exp. Immunol.* *141*, 21–28.
- Jackson, M., Raynaud, C., Lanéelle, M.A., Guilhot, C., Laurent-Winter, C., Ensergueix, D., Gicquel, B., and Daffé, M. (1999). Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol. Microbiol.* *31*, 1573–1587.
- Jackson, M., Crick, D.C., and Brennan, P.J. (2000). Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* *275*, 30092–30099.
- Jain, V., Kumar, M., and Chatterji, D. (2006a). ppGpp: stringent response and survival. *J. Microbiol. Seoul Korea* *44*, 1–10.
- Jain, V., Saleem-Batcha, R., China, A., and Chatterji, D. (2006b). Molecular dissection of the mycobacterial stringent response protein Rel. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *15*, 1449–1464.
- Janele, D., Lang, T., Capellino, S., Cutolo, M., Da Silva, J.A.P., and Straub, R.H. (2006). Effects of testosterone, 17 $\beta$ -estradiol, and downstream estrogens on cytokine secretion from human leukocytes in the presence and absence of cortisol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1069*, 168–182.
- Jarlier, V., and Nikaido, H. (1990). Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J. Bacteriol.* *172*, 1418–1423.





- Jarlier, V., and Nikaido, H. (1994). Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* *123*, 11–18.
- De Jong, B.C., Hill, P.C., Aiken, A., Awine, T., Antonio, M., Adetifa, I.M., Jackson-Sillah, D.J., Fox, A., DeRiemer, K., Gagneux, S., et al. (2008). Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *M. tuberculosis* lineage in The Gambia. *J. Infect. Dis.* *198*, 1037–1043.
- De Jong, B.C., Antonio, M., and Gagneux, S. (2010). *Mycobacterium africanum*—review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *4*, e744.
- Joshi, S.A., Ball, D.A., Sun, M.G., Carlsson, F., Watkins, B.Y., Aggarwal, N., McCracken, J.M., Huynh, K.K., and Brown, E.J. (2012). EccA1, a Component of the *Mycobacterium marinum* ESX-1 Protein Virulence Factor Secretion Pathway, Regulates Mycolic Acid Lipid Synthesis. *Chem. Biol.* *19*, 372–380.
- Kalscheuer, R., Weinrick, B., Veeraraghavan, U., Besra, G.S., and Jacobs, W.R. (2010). Trehalose-recycling ABC transporter LpqY-SugA-SugB-SugC is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 21761–21766.
- Kang, C.-M., Nyayapathy, S., Lee, J.-Y., Suh, J.-W., and Husson, R.N. (2008). Wag31, a homologue of the cell division protein DivIVA, regulates growth, morphology and polar cell wall synthesis in mycobacteria. *Microbiol. Read. Engl.* *154*, 725–735.
- Kanjee, U., Ogata, K., and Houry, W.A. (2012). Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* *85*, 1029–1043.
- Karakousis, P.C., Yoshimatsu, T., Lamichhane, G., Woolwine, S.C., Nuermberger, E.L., Grosset, J., and Bishai, W.R. (2004). Dormancy phenotype displayed by extracellular *Mycobacterium tuberculosis* within artificial granulomas in mice. *J. Exp. Med.* *200*, 647–657.
- Katona, P., and Katona-Apte, J. (2008). The interaction between nutrition and infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *46*, 1582–1588.
- Katti, M.K., Dai, G., Armitage, L.Y., Rivera Marrero, C., Daniel, S., Singh, C.R., Lindsey, D.R., Dhandayuthapani, S., Hunter, R.L., and Jagannath, C. (2008). The Delta *fbpA* mutant derived from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv has an enhanced susceptibility to intracellular antimicrobial oxidative mechanisms, undergoes limited phagosome maturation and activates macrophages and dendritic cells. *Cell. Microbiol.* *10*, 1286–1303.
- Van Kessel, J.C., and Hatfull, G.F. (2007). Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Methods* *4*, 147–152.
- Van Kessel, J.C., Marinelli, L.J., and Hatfull, G.F. (2008). Recombineering mycobacteria and their phages. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 851–857.
- Khan, S., Nagarajan, S.N., Parikh, A., Samantaray, S., Singh, A., Kumar, D., Roy, R.P., Bhatt, A., and Nandicoori, V.K. (2010). Phosphorylation of enoyl-acyl carrier protein reductase *InhA* impacts mycobacterial growth and survival. *J. Biol. Chem.* *285*, 37860–37871.
- Kim, M.-J., Park, K.-J., Ko, I.-J., Kim, Y.M., and Oh, J.-I. (2010). Different roles of DosS and DosT in the hypoxic adaptation of *Mycobacteria*. *J. Bacteriol.* *192*, 4868–4875.
- Kisich, K.O., Heifets, L., Higgins, M., and Diamond, G. (2001). Antimycobacterial agent based on mRNA encoding human beta-defensin 2 enables primary macrophages to restrict growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* *69*, 2692–2699.
- Klinkenberg, L.G., Lee, J.-H., Bishai, W.R., and Karakousis, P.C. (2010). The stringent response is required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *J. Infect. Dis.* *202*, 1397–1404.
- Kremer, L., Nampoothiri, K.M., Lesjean, S., Dover, L.G., Graham, S., Betts, J., Brennan, P.J., Minnikin, D.E., Locht, C., and Besra, G.S. (2001). Biochemical characterization of acyl carrier protein (AcpM) and malonyl-CoA:AcpM transacylase (mtFabD), two major components of *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. *J. Biol. Chem.* *276*, 27967–27974.
- Kulchavenya, E. (2014). Extrapulmonary tuberculosis: are statistical reports accurate?
- Kumar, A., Toledo, J.C., Patel, R.P., Lancaster, J.R., and Steyn, A.J.C. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 11568–11573.
- Kumar, A., Majid, M., Kunisch, R., Rani, P.S., Qureshi, I.A., Lewin, A., Hasnain, S.E., and Ahmed, N. (2012). *Mycobacterium tuberculosis* DosR Regulon Gene Rv0079 Encodes a Putative, “Dormancy Associated Translation Inhibitor (DATIN).” *PLoS ONE* *7*.
- Kurth, D.G., Gago, G.M., de la Iglesia, A., Bazet Lyonnet, B., Lin, T.-W., Morbidoni, H.R., Tsai, S.-C., and Gramajo, H. (2009). ACCase 6 is the essential acetyl-CoA carboxylase involved in fatty acid and mycolic acid biosynthesis in mycobacteria. *Microbiol. Read. Engl.* *155*, 2664–2675.
- Lacave, C., Laneelle, M.A., Daffe, M., Montrozier, H., and Laneelle, G. (1989). Mycolic acid metabolic filiation and location in *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium phlei*. *Eur. J. Biochem. FEBS* *181*, 459–466.



- Lang, R. (2013). Recognition of the mycobacterial cord factor by Mincle: relevance for granuloma formation and resistance to tuberculosis. *Front. Immunol.* *4*.
- Lederer, E., Adam, A., Ciorbaru, R., Petit, J.F., and Wietzerbin, J. (1975). Cell walls of Mycobacteria and related organisms; chemistry and immunostimulant properties. *Mol. Cell. Biochem.* *7*, 87–104.
- Léger, M., Gavalda, S., Guillet, V., van der Rest, B., Slama, N., Montrozier, H., Mourey, L., Quémard, A., Daffé, M., and Marrakchi, H. (2009). The dual function of the Mycobacterium tuberculosis FadD32 required for mycolic acid biosynthesis. *Chem. Biol.* *16*, 510–519.
- Leistikow, R.L., Morton, R.A., Bartek, I.L., Frimpong, I., Wagner, K., and Voskuil, M.I. (2010a). The Mycobacterium tuberculosis DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. *J. Bacteriol.* *192*, 1662–1670.
- Leistikow, R.L., Morton, R.A., Bartek, I.L., Frimpong, I., Wagner, K., and Voskuil, M.I. (2010b). The Mycobacterium tuberculosis DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. *J. Bacteriol.* *192*, 1662–1670.
- Lemassu, A., and Daffé, M. (1994). Structural features of the exocellular polysaccharides of Mycobacterium tuberculosis. *Biochem. J.* *297* ( Pt 2), 351–357.
- Leunda, A., Baldo, A., Goossens, M., Huygen, K., Herman, P., and Romano, M. (2014). Novel GMO-Based Vaccines against Tuberculosis: State of the Art and Biosafety Considerations. *Vaccines* *2*, 463–499.
- Li, W., and He, Z.-G. (2012). LtmA, a novel cyclic di-GMP-responsive activator, broadly regulates the expression of lipid transport and metabolism genes in Mycobacterium smegmatis. *Nucleic Acids Res.* *40*, 11292–11307.
- Li, H.T., Zhang, T.T., Zhou, Y.Q., Huang, Q.H., and Huang, J. (2006). SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* *10*, 3–12.
- Lin, W., Mathys, V., Ang, E.L.Y., Koh, V.H.Q., Martínez Gómez, J.M., Ang, M.L.T., Zainul Rahim, S.Z., Tan, M.P., Pethe, K., and Alonso, S. (2012). Urease activity represents an alternative pathway for Mycobacterium tuberculosis nitrogen metabolism. *Infect. Immun.* *80*, 2771–2779.
- Liu, J., Barry, C.E., Besra, G.S., and Nikaido, H. (1996). Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* *271*, 29545–29551.
- Liu, J., Tran, V., Leung, A.S., Alexander, D.C., and Zhu, B. (2009). BCG Vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum. Vaccin.* *5*, 70–78.
- Liu, P.T., Stenger, S., Tang, D.H., and Modlin, R.L. (2007). Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 2060–2063.
- Lockyer, C.R., and Gillatt, D.A. (2001). BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. *J. R. Soc. Med.* *94*, 119–123.
- Mahapatra, S., Scherman, H., Brennan, P.J., and Crick, D.C. (2005). N Glycolylation of the Nucleotide Precursors of Peptidoglycan Biosynthesis of Mycobacterium spp. Is Altered by Drug Treatment. *J. Bacteriol.* *187*, 2341–2347.
- Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., and Gerdes, K. (2013). (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell* *154*, 1140–1150.
- Maloney, E., Stankowska, D., Zhang, J., Fol, M., Cheng, Q.-J., Lun, S., Bishai, W.R., Rajagopalan, M., Chatterjee, D., and Madiraju, M.V. (2009). The Two-Domain LysX Protein of Mycobacterium tuberculosis Is Required for Production of Lysinylated Phosphatidylglycerol and Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides. *PLoS Pathog.* *5*.
- Manganelli, R. (2007). Polyphosphate and stress response in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* *65*, 258–260.
- Manganelli, R., Voskuil, M.I., Schoolnik, G.K., and Smith, I. (2001). The Mycobacterium tuberculosis ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol. Microbiol.* *41*, 423–437.
- Manjunatha, U., Boshoff, H.I., and Barry, C.E. (2009). The mechanism of action of PA-824: Novel insights from transcriptional profiling. *Commun. Integr. Biol.* *2*, 215–218.
- Manjunatha, U.H., Boshoff, H., Dowd, C.S., Zhang, L., Albert, T.J., Norton, J.E., Daniels, L., Dick, T., Pang, S.S., and Barry, C.E. (2006). Identification of a nitroimidazo-oxazine-specific protein involved in PA-824 resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 431–436.
- Marrakchi, H., Ducasse, S., Labesse, G., Montrozier, H., Margeat, E., Emorine, L., Charpentier, X., Daffé, M., and Quémard, A. (2002). MabA (FabG1), a Mycobacterium tuberculosis protein involved in the long-chain fatty acid elongation system FAS-II. *Microbiol. Read. Engl.* *148*, 951–960.
- Marrakchi, H., Lanéeelle, M.-A., and Daffé, M. (2014). Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem. Biol.* *21*, 67–85.



- Martin, C., Williams, A., Hernandez-Pando, R., Cardona, P.J., Gormley, E., Bordat, Y., Soto, C.Y., Clark, S.O., Hatch, G.J., Aguilar, D., et al. (2006). The live *Mycobacterium tuberculosis* phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine* 24, 3408–3419.
- Masip, L., Veeravalli, K., and Georgiou, G. (2006). The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 753–762.
- Mazurek, G.H., Jereb, J., Lobue, P., Iademarco, M.F., Metchock, B., Vernon, A., and Division of Tuberculosis Elimination, National Center for HIV, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2005). Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm. Rep. Morb. Mortal. Wkly. Rep. Recomm. Rep. Cent. Dis. Control* 54, 49–55.
- McNeil, M., Daffe, M., and Brennan, P.J. (1990). Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J. Biol. Chem.* 265, 18200–18206.
- McNeil, M., Daffe, M., and Brennan, P.J. (1991). Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 266, 13217–13223.
- Minch, K.J., Rustad, T.R., Peterson, E.J.R., Winkler, J., Reiss, D.J., Ma, S., Hickey, M., Brabant, W., Morrison, B., Turkarslan, S., et al. (2015). The DNA-binding network of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Commun.* 6, 5829.
- Minnikin, D.E. (1982). *The Biology of the Mycobacteria*. London: Academic Press 1, 95–184.
- Minnikin, D.E., Kremer, L., Dover, L.G., and Besra, G.S. (2002). The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biol.* 9, 545–553.
- Miotto, P., Forti, F., Ambrosi, A., Pellin, D., Veiga, D.F., Balazsi, G., Gennaro, M.L., Di Serio, C., Ghisotti, D., and Cirillo, D.M. (2012). Genome-wide discovery of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS One* 7, e51950.
- Miyazaki, E., Miyazaki, M., Chen, J.M., Chaisson, R.E., and Bishai, W.R. (1999). Moxifloxacin (BAY12-8039), a new 8-methoxyquinolone, is active in a mouse model of tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 85–89.
- Molle, V., and Kremer, L. (2010). Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol. Microbiol.* 75, 1064–1077.
- Molle, V., Brown, A.K., Besra, G.S., Cozzzone, A.J., and Kremer, L. (2006). The condensing activities of the *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase are differentially regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 281, 30094–30103.
- Molle, V., Gulten, G., Vilchèze, C., Veyron-Churlet, R., Zanella-Cléon, I., Sacchetti, J.C., Jacobs, W.R., and Kremer, L. (2010). Phosphorylation of *InhA* inhibits mycolic acid biosynthesis and growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 78, 1591–1605.
- Molloy, S. (2012). Bacterial pathogenesis: TB blurs the lines. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 442.
- Mondino, S., Gago, G., and Gramajo, H. (2013). Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 89, 372–387.
- Morales, A., Eidinger, D., and Bruce, A.W. (1976). Intracavitary *Bacillus Calmette-Guerin* in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.* 116, 180–183.
- Morlock, G.P., Metchock, B., Sikes, D., Crawford, J.T., and Cooksey, R.C. (2003). *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3799–3805.
- Mukhopadhyay, S., Nair, S., and Ghosh, S. (2012). Pathogenesis in tuberculosis: transcriptomic approaches to unraveling virulence mechanisms and finding new drug targets. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 463–485.
- Murphy, D.J., and Brown, J.R. (2007). Identification of gene targets against dormant phase *Mycobacterium tuberculosis* infections. *BMC Infect. Dis.* 7, 84.
- Murray, C.J., Styblo, K., and Rouillon, A. (1990). Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. *Bull. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 65, 6–24.
- Mwandumba, H.C., Russell, D.G., Nyirenda, M.H., Anderson, J., White, S.A., Molyneux, M.E., and Squire, S.B. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* resides in nonacidified vacuoles in endocytically competent alveolar macrophages from patients with tuberculosis and HIV infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 4592–4598.
- My, L., Rekoske, B., Lemke, J.J., Viala, J.P., Gourse, R.L., and Bouveret, E. (2013). Transcription of the *Escherichia coli* fatty acid synthesis operon *fabH* is directly activated by FadR and inhibited by ppGpp. *J. Bacteriol.* 195, 3784–3795.
- Newton, G.L., Buchmeier, N., and Fahey, R.C. (2008). Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 72, 471–494.



- Neyrolles, O., and Guilhot, C. (2011). Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberc. Edinb. Scotl.* *91*, 187–195.
- Neyrolles, O., and Quintana-Murci, L. (2009). Sexual Inequality in Tuberculosis. *PLoS Med.* *6*.
- Neyrolles, O., Wolschendorf, F., Mitra, A., and Niederweis, M. (2015). *Mycobacteria*, metals, and the macrophage. *Immunol. Rev.* *264*, 249–263.
- Ng, V.H., Cox, J.S., Sousa, A.O., MacMicking, J.D., and McKinney, J.D. (2004). Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol. Microbiol.* *52*, 1291–1302.
- Nguyen, L., and Pieters, J. (2009). Mycobacterial subversion of chemotherapeutic reagents and host defense tactics: challenges in tuberculosis drug development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *49*, 427–453.
- Nguyen, L., Chinnapapagari, S., and Thompson, C.J. (2005). FbpA-Dependent biosynthesis of trehalose dimycolate is required for the intrinsic multidrug resistance, cell wall structure, and colonial morphology of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* *187*, 6603–6611.
- Nickel, D., Busch, M., Mayer, D., Hagemann, B., Knoll, V., and Stenger, S. (2012). Hypoxia triggers the expression of human  $\beta$  defensin 2 and antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 4001–4007.
- Nikaido, H., and Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* *49*, 1–32.
- Noll, H., Bloch, H., Asselineau, J., and Lederer, E. (1956). The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim. Biophys. Acta* *20*, 299–309.
- Nuermberger, E.L., Yoshimatsu, T., Tyagi, S., O'Brien, R.J., Vernon, A.N., Chaisson, R.E., Bishai, W.R., and Grosset, J.H. (2004). Moxifloxacin-containing regimen greatly reduces time to culture conversion in murine tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *169*, 421–426.
- Odrizola, J.M., Ramos, J.A., and Bloch, K. (1977). Fatty acid synthetase activity in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of the acyl carrier protein-dependent elongating system. *Biochim. Biophys. Acta* *488*, 207–217.
- Oh, T.-J., Daniel, J., Kim, H.-J., Sirakova, T.D., and Kolattukudy, P.E. (2006). Identification and characterization of Rv3281 as a novel subunit of a biotin-dependent acyl-CoA Carboxylase in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J. Biol. Chem.* *281*, 3899–3908.
- Ojha, A., Anand, M., Bhatt, A., Kremer, L., Jacobs, W.R., and Hatfull, G.F. (2005). GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell* *123*, 861–873.
- Ojha, A.K., Baughn, A.D., Sambandan, D., Hsu, T., Trivelli, X., Guerardel, Y., Alahari, A., Kremer, L., Jacobs, W.R., and Hatfull, G.F. (2008). Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol. Microbiol.* *69*, 164–174.
- Oloya, J., Opuda-Asibo, J., Kazwala, R., Demelash, A.B., Skjerve, E., Lund, A., Johansen, T.B., and Djonje, B. (2008). *Mycobacteria* causing human cervical lymphadenitis in pastoral communities in the Karamoja region of Uganda. *Epidemiol. Infect.* *136*, 636–643.
- Onyebujoh, P.C., Ribeiro, I., and Whalen, C.C. (2007). Treatment Options for HIV-Associated Tuberculosis. *J. Infect. Dis.* *196 Suppl 1*, S35–S45.
- O'Reilly, L.M., and Daborn, C.J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* *76 Suppl 1*, 1–46.
- Ortalo-Magné, A., Andersen, A.B., and Daffé, M. (1996a). The outermost capsular arabinomannans and other mannoconjugates of virulent and avirulent tubercle bacilli. *Microbiol. Read. Engl.* *142 (Pt 4)*, 927–935.
- Ortalo-Magné, A., Lemassu, A., Lanéelle, M.A., Bardou, F., Silve, G., Gounon, P., Marchal, G., and Daffé, M. (1996b). Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species. *J. Bacteriol.* *178*, 456–461.
- Osman, D., and Cavet, J.S. (2010). Bacterial metal-sensing proteins exemplified by ArsR–SmtB family repressors. *Nat. Prod. Rep.* *27*, 668–680.
- Oztürk, A.B., Kiliçaslan, Z., and İşsever, H. (2014). Effect of smoking and indoor air pollution on the risk of tuberculosis: smoking, indoor air pollution and tuberculosis. *Tüberküloz Ve Toraks* *62*, 1–6.
- Padhi, A., Sengupta, M., Sengupta, S., Roehm, K.H., and Sonawane, A. (2014). Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: current status and future prospects. *Tuberc. Edinb. Scotl.* *94*, 363–373.
- Pang, X., Vu, P., Byrd, T.F., Ghanny, S., Soteropoulos, P., Mukamolova, G.V., Wu, S., Samten, B., and Howard, S.T. (2007a). Evidence for complex interactions of stress-associated regulons in an mprAB deletion mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Read. Engl.* *153*, 1229–1242.





- Pang, X., Vu, P., Byrd, T.F., Ghanny, S., Soteropoulos, P., Mukamolova, G.V., Wu, S., Samten, B., and Howard, S.T. (2007b). Evidence for complex interactions of stress-associated regulons in an *mprAB* deletion mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Read. Engl.* *153*, 1229–1242.
- Parish, T., Smith, D.A., Kendall, S., Casali, N., Bancroft, G.J., and Stoker, N.G. (2003). Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* *71*, 1134–1140.
- Parish, T., Roberts, G., Laval, F., Schaeffer, M., Daffé, M., and Duncan, K. (2007). Functional complementation of the essential gene *fabG1* of *Mycobacterium tuberculosis* by *Mycobacterium smegmatis* *fabG* but not *Escherichia coli* *fabG*. *J. Bacteriol.* *189*, 3721–3728.
- Park, H.-D., Guinn, K.M., Harrell, M.I., Liao, R., Voskuil, M.I., Tompa, M., Schoolnik, G.K., and Sherman, D.R. (2003). *Rv3133c/dosR* is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* *48*, 833–843.
- Park, J.S., Tamayo, M.H., Gonzalez-Juarrero, M., Orme, I.M., and Ordway, D.J. (2006). Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *79*, 80–86.
- Passemar, C. (2013). Etude du rôle des lipides de l'enveloppe de *Mycobacterium tuberculosis* dans la virulence et la pathogénie de la tuberculose. phd. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Paul, B.J., Barker, M.M., Ross, W., Schneider, D.A., Webb, C., Foster, J.W., and Gourse, R.L. (2004). *DksA*: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* *118*, 311–322.
- Pawelczyk, J., Brzostek, A., Kremer, L., Dziadek, B., Rumijowska-Galewicz, A., Fiolka, M., and Dziadek, J. (2011). *AccD6*, a key carboxyltransferase essential for mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, is dispensable in a nonpathogenic strain. *J. Bacteriol.* *193*, 6960–6972.
- Pawlowski, A., Jansson, M., Sköld, M., Rottenberg, M.E., and Källenius, G. (2012). Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathog.* *8*, e1002464.
- Pérez-Guerrero, L., Milián-Suazo, F., Arriaga-Díaz, C., Romero-Torres, C., and Escartín-Chávez, M. (2008). [Molecular epidemiology of cattle and human tuberculosis in Mexico]. *Salud Pública México* *50*, 286–291.
- Pérez-Lago, L., Navarro, Y., and García-de-Viedma, D. (2014). Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: a review. *Res. Vet. Sci.* *97 Suppl*, S94–S100.
- Peschel, A., and Sahl, H.-G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 529–536.
- Peyron, P., Vaubourgeix, J., Poquet, Y., Levillain, F., Botanch, C., Bardou, F., Daffé, M., Emile, J.-F., Marchou, B., Cardona, P.-J., et al. (2008). Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog.* *4*, e1000204.
- Pfiffer (2006). *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. - CAB Direct.
- Phetsuksiri, B., Jackson, M., Scherman, H., McNeil, M., Besra, G.S., Baulard, A.R., Slayden, R.A., DeBarber, A.E., Barry, C.E., Baird, M.S., et al. (2003). Unique mechanism of action of the thiourea drug isoxyl on *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* *278*, 53123–53130.
- Portevin, D., De Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffé, M., and Guilhot, C. (2004). A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 314–319.
- Portevin, D., de Sousa-D'Auria, C., Montrozier, H., Houssin, C., Stella, A., Lanéelle, M.-A., Bardou, F., Guilhot, C., and Daffé, M. (2005). The acyl-AMP ligase *FadD32* and *AccD4*-containing acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth: identification of the carboxylation product and determination of the acyl-CoA carboxylase components. *J. Biol. Chem.* *280*, 8862–8874.
- Potrykus, K., and Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Microbiol.* *62*, 35–51.
- Prescott, S., James, K., Hargreave, T.B., Chisholm, G.D., and Smyth, J.F. (1992). Intravesical Evans strain BCG therapy: quantitative immunohistochemical analysis of the immune response within the bladder wall. *J. Urol.* *147*, 1636–1642.
- Primm, T.P., Andersen, S.J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H., and Barry, C.E., 3rd (2000). The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J. Bacteriol.* *182*, 4889–4898.
- Puech, V., Bayan, N., Salim, K., Leblon, G., and Daffé, M. (2000). Characterization of the *in vivo* acceptors of the mycoloyl residues transferred by the corynebacterial *PS1* and the related mycobacterial antigens 85. *Mol. Microbiol.* *35*, 1026–1041.



- Puech, V., Guilhot, C., Perez, E., Tropis, M., Armitige, L.Y., Gicquel, B., and Daffé, M. (2002). Evidence for a partial redundancy of the fibronectin-binding proteins for the transfer of mycoloyl residues onto the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* *44*, 1109–1122.
- Quéward, A., Sacchettini, J.C., Dessen, A., Vilcheze, C., Bittman, R., Jacobs, W.R., and Blanchard, J.S. (1995). Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 8235–8241.
- Radosevic, K., Wieland, C.W., Rodriguez, A., Weverling, G.J., Mintardjo, R., Gillissen, G., Vogels, R., Skeiky, Y.A.W., Hone, D.M., Sadoff, J.C., et al. (2007). Protective immune responses to a recombinant adenovirus type 35 tuberculosis vaccine in two mouse strains: CD4 and CD8 T-cell epitope mapping and role of gamma interferon. *Infect. Immun.* *75*, 4105–4115.
- Ramirez, M.V., Cowart, K.C., Campbell, P.J., Morlock, G.P., Sikes, D., Winchell, J.M., and Posey, J.E. (2010). Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 4003–4009.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.-T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M.I., Rojas, A., Teran, W., and Segura, A. (2002). Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *56*, 743–768.
- Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R., and Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *69*, 326–356.
- Rao, N.N., Gómez-García, M.R., and Kornberg, A. (2009). Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 605–647.
- Rao, S.P.S., Alonso, S., Rand, L., Dick, T., and Pethe, K. (2008). The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11945–11950.
- Rao, V., Gao, F., Chen, B., Jacobs, W.R., and Glickman, M.S. (2006). Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses *Mycobacterium tuberculosis* -induced inflammation and virulence. *J. Clin. Invest.* *116*, 1660–1667.
- Raynaud, C., Etienne, G., Peyron, P., Lanéelle, M.A., and Daffé, M. (1998). Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Read. Engl.* *144 (Pt 2)*, 577–587.
- Reddy, T.B.K., Riley, R., Wymore, F., Montgomery, P., DeCaprio, D., Engels, R., Gellesch, M., Hubble, J., Jen, D., Jin, H., et al. (2009). TB database: an integrated platform for tuberculosis research. *Nucleic Acids Res.* *37*, D499–D508.
- Reddy, V.M., Einck, L., Andries, K., and Nacy, C.A. (2010). In vitro interactions between new antitubercular drug candidates SQ109 and TMC207. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 2840–2846.
- Rickards, B.R., Slack, F.H., and Arms, B.L. (1909). Longevity of *B. Tuberculosis* in Sputum. *Am. J. Public Hyg.* *19*, 586–594.
- Roberts, D.M., Liao, R.P., Wisedchaisri, G., Hol, W.G.J., and Sherman, D.R. (2004). Two Sensor Kinases Contribute to the Hypoxic Response of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* *279*, 23082–23087.
- Rock, C.O., and Cronan, J.E. (1996). *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1302*, 1–16.
- Rohde, K.H., Veiga, D.F.T., Caldwell, S., Balázs, G., and Russell, D.G. (2012). Linking the transcriptional profiles and the physiological states of *Mycobacterium tuberculosis* during an extended intracellular infection. *PLoS Pathog.* *8*, e1002769.
- Rosenfeld, N., Elowitz, M.B., and Alon, U. (2002). Negative autoregulation speeds the response times of transcription networks. *J. Mol. Biol.* *323*, 785–793.
- Rosenthal, I.M., Zhang, M., Williams, K.N., Peloquin, C.A., Tyagi, S., Vernon, A.A., Bishai, W.R., Chaisson, R.E., Grosset, J.H., and Nuermberger, E.L. (2007). Daily dosing of rifapentine cures tuberculosis in three months or less in the murine model. *PLoS Med.* *4*, e344.
- Rozwarski, D.A., Vilcheze, C., Sugantino, M., Bittman, R., and Sacchettini, J.C. (1999). Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD<sup>+</sup> and a C16 fatty acyl substrate. *J. Biol. Chem.* *274*, 15582–15589.
- De la Rua-Domenech, R. (2006). Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberc. Edinb. Scotl.* *86*, 77–109.
- Russell, D.G. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 39–47.
- Russell, D.G. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunol. Rev.* *240*, 252–268.
- Rustad, T.R., Sherrid, A.M., Minch, K.J., and Sherman, D.R. (2009a). Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell. Microbiol.* *11*, 1151–1159.



- Rustad, T.R., Sherrid, A.M., Minch, K.J., and Sherman, D.R. (2009b). Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell. Microbiol.* *11*, 1151–1159.
- Sacco, E. (2007). Identification et caractérisation de 3-hydroxyacyl déshydratases/2-trans-enoyl hydratases (R)-spécifiques potentiellement impliquées dans la biosynthèse de lipides chez le bacille tuberculeux (Toulouse 3).
- Sacco, E., Legendre, V., Laval, F., Zerbib, D., Montrozier, H., Eynard, N., Guilhot, C., Daffé, M., and Quémard, A. (2007a). Rv3389C from *Mycobacterium tuberculosis*, a member of the (R)-specific hydratase/dehydratase family. *Biochim. Biophys. Acta* *1774*, 303–311.
- Sacco, E., Covarrubias, A.S., O'Hare, H.M., Carroll, P., Eynard, N., Jones, T.A., Parish, T., Daffé, M., Bäckbro, K., and Quémard, A. (2007b). The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 14628–14633.
- Salzman, V., Mondino, S., Sala, C., Cole, S.T., Gago, G., and Gramajo, H. (2010). Transcriptional regulation of lipid homeostasis in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* *78*, 64–77.
- Sambandan, D., Dao, D.N., Weinrick, B.C., Vilchèze, C., Gurcha, S.S., Ojha, A., Kremer, L., Besra, G.S., Hatfull, G.F., and Jacobs, W.R. (2013). Keto-mycolic acid-dependent pellicle formation confers tolerance to drug-sensitive *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* *4*, e00222–00213.
- Sani, M., Houben, E.N.G., Geurtsen, J., Pierson, J., de Punder, K., van Zon, M., Wever, B., Piersma, S.R., Jiménez, C.R., Daffé, M., et al. (2010). Direct Visualization by Cryo-EM of the Mycobacterial Capsular Layer: A Labile Structure Containing ESX-1-Secreted Proteins. *PLoS Pathog.* *6*.
- Sapre, N., and Corcoran, N.M. (2013). Modulating the immune response to *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG): a novel way to increase the immunotherapeutic effect of BCG for treatment of bladder cancer? *BJU Int.* *112*, 852–853.
- Sarathy, J., Dartois, V., Dick, T., and Gengenbacher, M. (2013). Reduced drug uptake in phenotypically resistant nutrient-starved nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 1648–1653.
- Sasseti, C.M., Boyd, D.H., and Rubin, E.J. (2003). Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* *48*, 77–84.
- Schaeffer, M.L., Agnihotri, G., Volker, C., Kallender, H., Brennan, P.J., and Lonsdale, J.T. (2001). Purification and biochemical characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases KasA and KasB. *J. Biol. Chem.* *276*, 47029–47037.
- Schäfer, G., Jacobs, M., Wilkinson, R.J., and Brown, G.D. (2009). Non-opsonic recognition of *Mycobacterium tuberculosis* by phagocytes. *J. Innate Immun.* *1*, 231–243.
- Sherman, D.R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M.I., and Schoolnik, G.K. (2001). Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 7534–7539.
- Shi, L., Sohaskey, C.D., Pfeiffer, C., Datta, P., Parks, M., McFadden, J., North, R.J., and Gennaro, M.L. (2010). Carbon flux rerouting during *Mycobacterium tuberculosis* growth arrest. *Mol. Microbiol.* *78*, 1199–1215.
- Shiloh, M.U., Manzanillo, P., and Cox, J.S. (2008). *Mycobacterium tuberculosis* senses host-derived carbon monoxide during macrophage infection. *Cell Host Microbe* *3*, 323–330.
- Shui, G., Bendt, A.K., Pethe, K., Dick, T., and Wenk, M.R. (2007). Sensitive profiling of chemically diverse bioactive lipids. *J. Lipid Res.* *48*, 1976–1984.
- Sielaff, B., Lee, K.S., and Tsai, F.T.F. (2011). Structural and functional conservation of *Mycobacterium tuberculosis* GroEL paralogs suggests that GroEL1 is a chaperonin. *J. Mol. Biol.* *405*, 831–839.
- Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., and Enninga, J. (2012). Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog.* *8*, e1002507.
- Sirakova, T.D., Dubey, V.S., Deb, C., Daniel, J., Korotkova, T.A., Abomoelak, B., and Kolattukudy, P.E. (2006). Identification of a diacylglycerol acyltransferase gene involved in accumulation of triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis* under stress. *Microbiol. Read. Engl.* *152*, 2717–2725.
- Sivaramakrishnan, S., and Ortiz de Montellano, P.R. (2013). The DosS-DosT/DosR Mycobacterial Sensor System. *Biosensors* *3*, 259–282.
- Skipconoka, V., Danilovits, M., Pehme, L., Tomson, T., Skenders, G., Kummik, T., Cirule, A., Leimane, V., Kurve, A., Levina, K., et al. (2013). Delamanid improves outcomes and reduces mortality in multidrug-resistant tuberculosis. *Eur. Respir. J.* *41*, 1393–1400.



- Slama, N., Leiba, J., Eynard, N., Daff , M., Kremer, L., Quémard, A., and Molle, V. (2011). Negative regulation by Ser/Thr phosphorylation of HadAB and HadBC dehydratases from *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *412*, 401–406.
- Slayden, R.A., and Barry, C.E. (2002). The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc. Edinb. Scotl.* *82*, 149–160.
- Smith, T., Wolff, K.A., and Nguyen, L. (2013). Molecular biology of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *374*, 53–80.
- Lea-Smith, D.J., Pyke, J.S., Tull, D., McConville, M.J., Coppel, R.L., and Crellin, P.K. (2007). The reductase that catalyzes mycolic motif synthesis is required for efficient attachment of mycolic acids to arabinogalactan. *J. Biol. Chem.* *282*, 11000–11008.
- Sohaskey, C.D. (2005). Regulation of nitrate reductase activity in *Mycobacterium tuberculosis* by oxygen and nitric oxide. *Microbiol. Read. Engl.* *151*, 3803–3810.
- Sohaskey, C.D. (2008). Nitrate enhances the survival of *Mycobacterium tuberculosis* during inhibition of respiration. *J. Bacteriol.* *190*, 2981–2986.
- Sohaskey, C.D., and Wayne, L.G. (2003). Role of narK2X and narGHJI in hypoxic upregulation of nitrate reduction by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* *185*, 7247–7256.
- Sonawane, A., Santos, J.C., Mishra, B.B., Jena, P., Progida, C., Sorensen, O.E., Gallo, R., Appelberg, R., and Griffiths, G. (2011). Cathelicidin is involved in the intracellular killing of mycobacteria in macrophages. *Cell. Microbiol.* *13*, 1601–1617.
- Sotgiu, G., Centis, R., D’Ambrosio, L., Alffenaar, J.-W.C., Anger, H.A., Caminero, J.A., Castiglia, P., De Lorenzo, S., Ferrara, G., Koh, W.-J., et al. (2012). Efficacy, safety and tolerability of linezolid containing regimens in treating MDR-TB and XDR-TB: systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* *40*, 1430–1442.
- De Souza, M.V.N., Ferreira, M. de L., Pinheiro, A.C., Saraiva, M.F., de Almeida, M.V., and Valle, M.S. (2008). Synthesis and biological aspects of mycolic acids: an important target against *Mycobacterium tuberculosis*. *ScientificWorldJournal* *8*, 720–751.
- Srivastava, D.B., Leon, K., Osmundson, J., Garner, A.L., Weiss, L.A., Westblade, L.F., Glickman, M.S., Landick, R., Darst, S.A., Stallings, C.L., et al. (2013). Structure and function of CarD, an essential mycobacterial transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 12619–12624.
- Stallings, C.L., Stephanou, N.C., Chu, L., Hochschild, A., Nickels, B.E., and Glickman, M.S. (2009). CarD is an essential regulator of rRNA transcription required for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *Cell* *138*, 146–159.
- Stein, J.P., and Bloch, K.E. (1976). Inhibition of *E. coli* beta-hydroxydecanoyl thioester dehydrase by ppGpp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *73*, 881–884.
- Stewart, J.N., Rivera, H.N., Karls, R., Quinn, F.D., Roman, J., and Rivera-Marrero, C.A. (2006). Increased pathology in lungs of mice after infection with an alpha-crystallin mutant of *Mycobacterium tuberculosis*: changes in cathepsin proteases and certain cytokines. *Microbiol. Read. Engl.* *152*, 233–244.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J., and Russell, D.G. (1994). Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* *263*, 678–681.
- Sulzenbacher, G., Canaan, S., Bordat, Y., Neyrolles, O., Stadthagen, G., Roig-Zamboni, V., Rauzier, J., Maurin, D., Laval, F., Daff , M., et al. (2006). LppX is a lipoprotein required for the translocation of phthiocerol dimycocerosates to the surface of *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO J.* *25*, 1436–1444.
- Sureka, K., Dey, S., Datta, P., Singh, A.K., Dasgupta, A., Rodrigue, S., Basu, J., and Kundu, M. (2007). Polyphosphate kinase is involved in stress-induced mprAB-sigE-rel signalling in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* *65*, 261–276.
- Sureka, K., Ghosh, B., Dasgupta, A., Basu, J., Kundu, M., and Bose, I. (2008). Positive feedback and noise activate the stringent response regulator rel in mycobacteria. *PloS One* *3*, e1771.
- Svitil, A.L., Cashel, M., and Zyskind, J.W. (1993). Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis in vivo. A possible protective mechanism for starvation stress in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *268*, 2307–2311.
- Tahlan, K., Wilson, R., Kastrinsky, D.B., Arora, K., Nair, V., Fischer, E., Barnes, S.W., Walker, J.R., Alland, D., Barry, C.E., et al. (2012). SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 1797–1809.
- Takayama, K., Wang, C., and Besra, G.S. (2005). Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*, 81–101.





- Thanky, N.R., Young, D.B., and Robertson, B.D. (2007). Unusual features of the cell cycle in mycobacteria: polar-restricted growth and the snapping-model of cell division. *Tuberc. Edinb. Scotl.* *87*, 231–236.
- Thayil, S.M., Morrison, N., Schechter, N., Rubin, H., and Karakousis, P.C. (2011). The role of the novel exopolyphosphatase MT0516 in *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance and persistence. *PloS One* *6*, e28076.
- Touchette, M.H., Holsclaw, C.M., Previti, M.L., Solomon, V.C., Leary, J.A., Bertozzi, C.R., and Seeliger, J.C. (2015). The rv1184c locus encodes Chp2, an acyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis* polyacyltrehalose lipid biosynthesis. *J. Bacteriol.* *197*, 201–210.
- Trivedi, O.A., Arora, P., Sridharan, V., Tickoo, R., Mohanty, D., and Gokhale, R.S. (2004). Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature* *428*, 441–445.
- Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., and Tada, K. (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* *42*, 1530–1536.
- Turnbough, C.L. (2008). Regulation of bacterial gene expression by the NTP substrates of transcription initiation. *Mol. Microbiol.* *69*, 10–14.
- Valdez, M.M., Clark, J.I., Wu, G.J.S., and Muchowski, P.J. (2002). Functional similarities between the small heat shock proteins *Mycobacterium tuberculosis* HSP 16.3 and human alphaB-crystallin. *Eur. J. Biochem. FEBS* *269*, 1806–1813.
- Varela, C., Rittmann, D., Singh, A., Krumbach, K., Bhatt, K., Eggeling, L., Besra, G.S., and Bhatt, A. (2012). MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria. *Chem. Biol.* *19*, 498–506.
- Velasco-Velázquez, M.A., Barrera, D., González-Arenas, A., Rosales, C., and Agramonte-Hevia, J. (2003). Macrophage–*Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3. *Microb. Pathog.* *35*, 125–131.
- Velayati, A.A., Masjedi, M.R., Farnia, P., Tabarsi, P., Ghanavi, J., Ziazarifi, A.H., and Hoffner, S.E. (2009). Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. *Chest* *136*, 420–425.
- Vergne, I., Chua, J., Lee, H.-H., Lucas, M., Belisle, J., and Deretic, V. (2005). Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 4033–4038.
- Veyron-Churlet, R., Guerrini, O., Mourey, L., Daffé, M., and Zerbib, D. (2004). Protein-protein interactions within the Fatty Acid Synthase-II system of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for mycobacterial viability. *Mol. Microbiol.* *54*, 1161–1172.
- Veyron-Churlet, R., Bigot, S., Guerrini, O., Verdoux, S., Malaga, W., Daffé, M., and Zerbib, D. (2005). The Biosynthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis* Relies on Multiple Specialized Elongation Complexes Interconnected by Specific Protein–Protein Interactions. *J. Mol. Biol.* *353*, 847–858.
- Veyron-Churlet, R., Molle, V., Taylor, R.C., Brown, A.K., Besra, G.S., Zanella-Cléon, I., Fütterer, K., and Kremer, L. (2009). The *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III activity is inhibited by phosphorylation on a single threonine residue. *J. Biol. Chem.* *284*, 6414–6424.
- Veyron-Churlet, R., Zanella-Cléon, I., Cohen-Gonsaud, M., Molle, V., and Kremer, L. (2010). Phosphorylation of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase MabA regulates mycolic acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *285*, 12714–12725.
- Vilchèze, C., Morbidoni, H.R., Weisbrod, T.R., Iwamoto, H., Kuo, M., Sacchettini, J.C., and Jacobs, W.R. (2000). Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* *182*, 4059–4067.
- Vilchèze, C., Av-Gay, Y., Attarian, R., Liu, Z., Hazbón, M.H., Colangeli, R., Chen, B., Liu, W., Alland, D., Sacchettini, J.C., et al. (2008). Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* *69*, 1316–1329.
- Vilchèze, C., Molle, V., Carrère-Kremer, S., Leiba, J., Mourey, L., Shenai, S., Baronian, G., Tufariello, J., Hartman, T., Veyron-Churlet, R., et al. (2014). Phosphorylation of KasB regulates virulence and acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* *10*, e1004115.
- Vogels, R., Zuijgeest, D., van Rijnsoever, R., Hartkoorn, E., Damen, I., de Béthune, M.-P., Kostense, S., Penders, G., Helmus, N., Koudstaal, W., et al. (2003). Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J. Virol.* *77*, 8263–8271.
- Voskuil, M.I., Schnappinger, D., Visconti, K.C., Harrell, M.I., Dolganov, G.M., Sherman, D.R., and Schoolnik, G.K. (2003). Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J. Exp. Med.* *198*, 705–713.
- Voskuil, M.I., Visconti, K.C., and Schoolnik, G.K. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. *Tuberc. Edinb. Scotl.* *84*, 218–227.
- Vynnycky, E., and Fine, P.E. (2000). Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. *Am. J. Epidemiol.* *152*, 247–263.



- Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., and Pieters, J. (2004). Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 304, 1800–1804.
- Wallis, R.S., Jakubiec, W.M., Kumar, V., Silvia, A.M., Paige, D., Dimitrova, D., Li, X., Ladutko, L., Campbell, S., Friedland, G., et al. (2010). Pharmacokinetics and whole-blood bactericidal activity against *Mycobacterium tuberculosis* of single doses of PNU-100480 in healthy volunteers. *J. Infect. Dis.* 202, 745–751.
- Wang, F., Langley, R., Gulten, G., Dover, L.G., Besra, G.S., Jacobs, W.R., and Sacchettini, J.C. (2007). Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *J. Exp. Med.* 204, 73–78.
- Ward, S.K., Abomoelak, B., Hoye, E.A., Steinberg, H., and Talaat, A.M. (2010). CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 77, 1096–1110.
- Watanabe, M., Aoyagi, Y., Mitome, H., Fujita, T., Naoki, H., Ridell, M., and Minnikin, D.E. (2002). Location of functional groups in mycobacterial meromycolate chains; the recognition of new structural principles in mycolic acids. *Microbiol. Read. Engl.* 148, 1881–1902.
- Wayne, L.G., and Hayes, L.G. (1998). Nitrate reduction as a marker for hypoxic shutdown of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 79, 127–132.
- Wayne, L.G., and Sohaskey, C.D. (2001). Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 139–163.
- Weber, I., Fritz, C., Ruttkowski, S., Kreft, A., and Bange, F.-C. (2000). Anaerobic nitrate reductase (narGHJI) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Mol. Microbiol.* 35, 1017–1025.
- Weinzirl, J. (1906). The Action of Sunlight upon Bacteria with Special Reference to *B. tuberculosis*. *Public Health Pap. Rep.* 32, 128–153.
- Weiss, L.A., and Stallings, C.L. (2013). Essential roles for *Mycobacterium tuberculosis* Rel beyond the production of (p)ppGpp. *J. Bacteriol.* 195, 5629–5638.
- Weiss, L.A., Harrison, P.G., Nickels, B.E., Glickman, M.S., Campbell, E.A., Darst, S.A., and Stallings, C.L. (2012). Interaction of CarD with RNA polymerase mediates *Mycobacterium tuberculosis* viability, rifampin resistance, and pathogenesis. *J. Bacteriol.* 194, 5621–5631.
- Welin, A., and Lerm, M. (2012). Inside or outside the phagosome? The controversy of the intracellular localization of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc. Edinb. Scotl.* 92, 113–120.
- Welin, A., Winberg, M.E., Abdalla, H., Särndahl, E., Rasmusson, B., Stendahl, O., and Lerm, M. (2008). Incorporation of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. *Infect. Immun.* 76, 2882–2887.
- Van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., Brenner, M., and Peters, P.J. (2007). *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129, 1287–1298.
- Wendrich, T.M., Blaha, G., Wilson, D.N., Marahiel, M.A., and Nierhaus, K.H. (2002). Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol. Cell* 10, 779–788.
- Werngren, J., Wijkander, M., Perskvist, N., Balasubramanian, V., Sambandamurthy, V.K., Rodrigues, C., and Hoffner, S. (2014). In vitro activity of AZD5847 against geographically diverse clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4222–4223.
- Wilson, T., de Lisle, G.W., Marcinkiewicz, J.A., Blanchard, J.S., and Collins, D.M. (1998). Antisense RNA to *ahpC*, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that *AhpC* of *Mycobacterium bovis* has virulence properties. *Microbiol. Read. Engl.* 144 ( Pt 10), 2687–2695.
- Wolschendorf, F., Ackart, D., Shrestha, T.B., Hascall-Dove, L., Nolan, S., Lamichhane, G., Wang, Y., Bossmann, S.H., Basaraba, R.J., and Niederweis, M. (2011). Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1621–1626.
- Xie, Z., Siddiqi, N., and Rubin, E.J. (2005). Differential antibiotic susceptibilities of starved *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4778–4780.
- Xu, W., Zhang, L., Mai, J., Peng, R., Yang, E., Peng, C., and Wang, H. (2014). The Wag31 protein interacts with AccA3 and coordinates cell wall lipid permeability and lipophilic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 448, 255–260.
- Yamada, H., Bhatt, A., Danev, R., Fujiwara, N., Maeda, S., Mitarai, S., Chikamatsu, K., Aono, A., Nitta, K., Jacobs, W.R., et al. (2012). Non-acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis*  $\Delta$ kasB mutant correlates with the cell envelope electron density. *Tuberc. Edinb. Scotl.* 92, 351–357.
- Yates, R.M., Hermetter, A., and Russell, D.G. (2005). The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic Cph. Den.* 6, 413–420.



- Young, D.B., Gideon, H.P., and Wilkinson, R.J. (2009). Eliminating latent tuberculosis. *Trends Microbiol.* *17*, 183–188.
- Yuan, Y., Zhu, Y., Crane, D.D., and Barry, C.E. (1998). The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* *29*, 1449–1458.
- Zahrt, T.C., and Deretic, V. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 12706–12711.
- Zhang, Y.-M., and Rock, C.O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 222–233.
- Zhang, Y.-M., and Rock, C.O. (2009). Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S115–S119.
- Zhang, Y., and Yew, W.W. (2009). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* *13*, 1320–1330.
- Zhang, Y.J., Ioerger, T.R., Huttenhower, C., Long, J.E., Sasseti, C.M., Sacchettini, J.C., and Rubin, E.J. (2012). Global assessment of genomic regions required for growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* *8*, e1002946.
- Zimhony, O., Vilchèze, C., and Jacobs, W.R. (2004). Characterization of *Mycobacterium smegmatis* expressing the *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I (*fasI*) gene. *J. Bacteriol.* *186*, 4051–4055.
- Zimhony, O., Schwarz, A., Raites-Gurevich, M., Peleg, Y., Dym, O., Albeck, S., Burstein, Y., and Shakked, Z. (2015). AcpM, the Meromycolate Extension Acyl Carrier Protein of *Mycobacterium tuberculosis*, Is Activated by the 4'-Phosphopantetheinyl Transferase PptT, a Potential Target of the Multistep Mycolic Acid Biosynthesis. *Biochemistry (Mosc.)* *54*, 2360–2371.
- Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., and Daffè, M. (2008). Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J. Bacteriol.* *190*, 5672–5680.
- Zumla, A., Nahid, P., and Cole, S.T. (2013). Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 388–404.



## Abstract

*Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*), the causative agent of tuberculosis infects one third of the world population with 9 million new cases and 1.5 million deaths each year. The capability of the bacteria to persist in its host and the emergence of multi- and totally-drug resistant strains explain these dramatic statistics. Therefore, the discovery of new drugs through a better understanding of the physiology and of the adaptive genetic programs of the pathogen is a priority.

*Mtb* is a Gram + bacilli with an unusual cell envelope characterized by an outer membrane (the mycomembrane) essential to its viability and virulence. This membrane is mainly composed of mycolic acids (MAs), a class of very long chain fatty acids which are modified by the introduction of functional groups. To date the biosynthesis of MAs is biochemically well characterized, but some data need to be confirmed in vivo, likewise there is little information about the regulation and the contribution of biosynthesis genes in the adaptive capacity of mycobacteria.

Around thirty genes are involved in the biosynthesis of MAs including *hadA*, *hadB* and *hadC* which are required for an essential dehydration reaction. It has been shown biochemically that HadB bears the catalytic activity and that HadA and HadC bring about the substrate specificity. In this study, using a genetic approach, we have shown that only HadB was essential to the viability but that the non-essential HadA and HadC proteins played a major role in the physiology, the adaptive capacity and the virulence of mycobacteria. These results have not only confirmed the biochemical data on the role of HadC in the biosynthesis of MAs, but have also underlined the relevance of a strategy based on weakening the fitness of *Mtb*, making the pathogen more susceptible to existing therapy as well as to the natural host defenses.

Phylogenetic and experimental analyses of gene expression allowed us to rationalize the evolutionary scenario that has shaped the *hadABC* locus. In agreement with the genetic organization, I have shown that starvation, a stress experienced by the bacterium upon infection, resulted into the co-repression of the genes *hadABC* as well as most of the MAs biosynthetic genes with genes involved in the translation process. The translation potential is known to be controlled by nutrient availability, especially through the stringent response, an adaptive response widely conserved in bacteria. Following these results a model was proposed stating that during the stringent response, the MAs intermediate products would be redirected toward the synthesis of alternate lipids including storage lipids. Phylogenetic analysis also suggested a close functional relationship between the activity of HadABC proteins and the enzymes involved in the modification of MAs.

In order to get an integrated picture of the regulation of the biosynthesis of the mycomembrane, we analyzed the biological role of *rv0081*, a gene encoding a transcription factor. Various comprehensive approaches suggested that Rv0081 plays a key role in *M.tb* adaptive capacity through the regulation of many genes involved in various cellular functions including the *hadABC* genes. In my PhD work I have shown that an *rv0081* deleted strain was hypervirulent and that the inability of the bacteria to properly regulate the gene had prevented the bacteria to survive within macrophages.



**AUTEUR :** Stevie JAMET

**TITRE :** Fonction et régulation des gènes de biosynthèse des acides mycoliques chez les mycobactéries

**DIRECTEUR DE THESE :** Dr. Kaymeuang CAM

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :** Salle Fernand Gallais (LCC, 205 Route de Narbonne, 31077 TOULOUSE), le 22 septembre 2015

---

## Résumé

*Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) l'agent étiologique de la tuberculose infecte un tiers de la population mondiale avec 9 millions de nouveaux cas et 1.5 millions de décès chaque année. La capacité de la bactérie à persister dans son hôte ainsi que l'apparition croissante de souches multi-résistantes voire totalement résistantes expliquent ces statistiques dramatiques. La découverte de nouveaux traitements à travers une meilleure connaissance de la physiologie et des programmes génétiques adaptatifs du pathogène est donc une priorité mondiale.

*M.tb* est un bacille à Gram+ avec une enveloppe particulière caractérisée par une membrane externe (la mycomembrane) essentielle à sa viabilité et sa virulence. Cette membrane est constituée majoritairement d'acides mycoliques (AMs), des acides gras à très longues chaînes modifiés par l'introduction de groupements fonctionnels. Bien qu'à ce jour la biosynthèse des AMs est relativement bien caractérisée d'un point de vue biochimique, certaines données nécessitent d'être confirmées *in vivo*, de même qu'il existe peu d'information sur la régulation et la contribution des gènes de biosynthèse à la capacité adaptative des mycobactéries.

Une trentaine de gènes sont impliqués dans la biosynthèse des AMs dont *hadA*, *hadB* et *hadC* codant pour une réaction de déshydratation essentielle. Il a été démontré biochimiquement que HadB porte l'activité catalytique et que HadA et HadC apportent la spécificité de substrats. Au cours de ma thèse, par une approche génétique, nous avons montré que seule HadB était essentielle à la viabilité mais que HadA et HadC bien que non essentielles jouaient un rôle majeur dans la physiologie, la capacité adaptative et la virulence des mycobactéries, en relation avec leur rôle dans la structure des AMs. Ces résultats avaient non seulement confirmé les données biochimiques quant au rôle de HadC dans la biosynthèse des AMs, mais également souligné l'intérêt d'une stratégie de lutte basée sur l'affaiblissement du fitness de *M.tb*, rendant ainsi le pathogène plus sensible aux traitements déjà existants ainsi qu'aux défenses naturelles de l'hôte.

Une analyse phylogénétique couplée à une analyse expérimentale de l'expression des gènes nous a permis de retracer et de rationaliser le scénario évolutif qui a façonné le locus *hadABC*. En accord avec l'organisation génétique, j'ai ainsi montré que la carence en nutriments, un stress rencontré par la bactérie lors de l'infection, conduisait à la co-répression des gènes *hadABC* ainsi que de la plupart des gènes de biosynthèse des AMs avec des gènes impliqués dans le processus de traduction. Le potentiel de traduction est connu pour être contrôlé par la disponibilité en nutriments, à travers notamment la réponse stringente, une réponse adaptative universellement conservée chez les bactéries. Suite à ces résultats, un modèle a été proposé selon lequel au cours de la réponse stringente, les intermédiaires de synthèse des AMs, seraient détournés au profit de la synthèse de lipides alternatifs dont des lipides de stockage. L'analyse phylogénétique a également suggéré une relation fonctionnelle étroite entre l'activité des enzymes HadABC et des enzymes responsables de la modification des AMs.

Afin d'avoir une vision intégrée de la régulation de la synthèse de la mycomembrane, nous avons analysé le rôle biologique du gène *rv0081* codant pour un facteur de transcription global. Différentes approches systémiques suggéraient que Rv0081 jouerait un rôle central dans la capacité adaptative de *M.tb* en régulant de nombreux gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires dont les gènes *hadABC*. J'ai pu montrer qu'un mutant *rv0081* était hypervirulent et que l'absence d'une régulation naturelle du gène affectait la capacité de survie de la bactérie à l'intérieur des macrophages.

---

**MOTS-CLES :** Mycobactéries, fonction, régulation, biosynthèse, acides mycoliques

**DICIPLINE :** Microbiologie

**INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :** Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), CNRS UMR 5089. 205 Route de Narbonne, 31077 TOULOUSE